



Analyse des transcriptomes du cerveau de souris : mise en évidence de patrons régionaux d'expression conservés chez l'homme et altérés dans des modèles de maladies neurodégénératives

Camille Brochier

► To cite this version:

Camille Brochier. Analyse des transcriptomes du cerveau de souris : mise en évidence de patrons régionaux d'expression conservés chez l'homme et altérés dans des modèles de maladies neurodégénératives. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT: . tel-00361207

HAL Id: tel-00361207

<https://theses.hal.science/tel-00361207>

Submitted on 13 Feb 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE PARIS SUD-XI
FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY**

Année 2007

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

**SPECIALITE : GENOMIQUE
ECOLE DOCTORALE : « GENES, GENOMES, CELLULES »**

présentée et soutenue publiquement par

Camille BROCHIER

Le 21 Septembre 2007

**Analyse des transcriptomes du cerveau de souris :
Mise en évidence de patrons régionaux d'expression
conservés chez l'homme et altérés dans des modèles de
maladies neurodégénératives**

JURY

Mme Monique BOLOTIN-FUKUHARA	Présidente
Mme Brigitte KIEFFER	Rapporteuse
M. Gilbert VASSART	Rapporteur
Melle Tania VITALIS	Examinatrice
M. Jean-Marc ELALOUF	Directeur de thèse

TABLE DES MATIERES

OBJECTIFS DE LA THESE	13
INTRODUCTION.....	15
I Génomique fonctionnelle du cerveau.....	15
<i>I.1 Les études par puces à ADN.....</i>	<i>16</i>
I.1.1 Principe expérimental.....	16
I.1.2 Applications en neurobiologie.....	16
<i>I.2 Les études par SAGE.....</i>	<i>21</i>
I.2.1 Principe expérimental.....	21
I.2.2 Applications en neurobiologie.....	21
<i>I.3 Les autres études.....</i>	<i>24</i>
I.3.1 L'hybridation <i>in situ</i>	24
I.3.2 Le projet GENSAT.....	24
I.3.3 Le MPSS.....	25
I.3.4 Analyses de l'expression sur cellules isolées	25
I.3.5 La RT-PCR quantitative	26
II Choix de la méthode d'analyse : SAGE.....	27
<i>II.1 La méthode originale</i>	<i>28</i>
<i>II.2 Les développements de la méthode</i>	<i>31</i>
II.2.1 Adaptation à l'étude de petits échantillons.....	31
II.2.1.1 SADE, miniSAGE et microSAGE.....	31
II.2.1.2 SAGE-Lite et PCR-SAGE	32
II.2.1.3 Small amplified RNA-SAGE (SAR-SAGE).....	32
II.2.2 Annotation des tags	32
II.2.2.1 LongSAGE.....	32
II.2.2.2 SuperSAGE.....	33
II.2.2.3 Generation of longer 3' cDNA from SAGE tags for gene identification (GLGI) ..	34
II.2.3 Cap analysis of gene expression (CAGE).....	34
II.2.4 Paired-end ditag.....	34
<i>II.3 Avantages et limites</i>	<i>34</i>
III Les ganglions de la base	37
<i>III.1 Evolution historique du concept de ganglions de la base.....</i>	<i>37</i>
<i>III.2 Anatomie descriptive des ganglions de la base.....</i>	<i>38</i>
III.2.1 Le striatum.....	38
III.2.1.1 Subdivisions anatomiques.....	38
III.2.1.2 Cytologie.....	39
III.2.1.2.1 Les neurones de projection : les neurones épineux.	39
III.2.1.2.2 Interneurones.....	40
III.2.1.3 Les domaines fonctionnels : matrice et striosomes.....	41
III.2.2 Le noyau accumbens	42
III.2.3 Le Globus Pallidus	43
III.2.4 Le noyau subthalamique.....	44
III.2.5 La substance noire et les structures dopaminergiques du mésencéphale	44
III.2.5.1 La substance noire.....	44

III.2.5.2	Les structures dopaminergiques du mésencéphale	45
III.3	<i>Les afférences des ganglions de la base</i>	46
III.3.1	Les projections cortico-striatales.....	47
III.3.2	Les projections nigro-striatales	47
III.3.3	Les projections thalamo-striatales	52
III.3.4	Autres afférences striatales.....	53
III.4	<i>Les voies de sortie et les boucles des ganglions de la base</i>	54
III.5	<i>Les circuits internes des ganglions de la base : les voies directe et indirecte</i>	55
III.5.1	Le modèle classique	55
III.5.2	La remise en cause du modèle classique	56
III.5.2.1	Structures d'entrée et de sortie.....	56
III.5.2.2	Voies directe et indirecte	56
IV	La maladie de Huntington	58
IV.1	<i>Caractéristiques cliniques</i>	58
IV.2	<i>Caractéristiques neurochimiques et neuropathologiques</i>	60
IV.3	<i>Génétique</i>	61
IV.4	<i>Epidémiologie</i>	62
IV.5	<i>Huntingtine et physiopathologie</i>	62
IV.6	<i>Modèles</i>	66
IV.6.1	Modèles murins	66
IV.6.1.1	Changements comportementaux des souris R6	67
IV.6.1.2	Pathologie cérébrale dans les souris R6	67
IV.6.2	Modèles cellulaires – Modèle lentiviral	68
V	La maladie de Parkinson	70
V.1	<i>Caractéristiques cliniques</i>	70
V.2	<i>Caractéristiques neurochimiques et neuropathologiques</i>	71
V.3	<i>Etiologie</i>	74
V.4	<i>Génétique</i>	75
V.5	<i>Physiopathologie</i>	77
V.5.1	Repliement et agrégation des protéines	78
V.5.2	Dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydant.....	80
V.6	<i>Les modèles animaux pharmacologiques</i>	80
V.6.1	MPTP.....	81
V.6.1.1	Mécanismes d'action	81
V.6.1.2	Protocoles d'intoxication	82
V.6.2	6-OHDA	85
V.6.2.1	Mécanismes d'action	85
V.6.2.2	Mode d'administration.....	88
CHAPITRE I – CARACTERISATION D'UN NOUVEAU MARQUEUR DU STRIATUM CHEZ LA SOURIS : CAPUCINE		89
I	Introduction	89
II	Publication n°1 : « Capucin : A novel striatal marker down-regulated in rodent models of Huntington disease »	90

III	Discussion	91
CHAPITRE II – ETUDE DES TRANSCRIPTOMES DE DIFFERENTES REGIONS CEREBRALES PAR ANALYSE EN SERIE DE L'EXPRESSION DES GENES..... 93		
I	Introduction	93
II	Analyse des banques SADE et LongSADE.....	95
II.1	Analyse des séquences	95
II.2	Analyse des tags.....	95
II.2.1	Nombre de tags par concatémère.....	95
II.2.2	Tags correspondant aux adaptateurs.....	95
II.2.3	Ditags dupliqués	96
II.2.4	Tags attribués à des erreurs de séquence	97
II.3	Identification des tags.....	98
III	Publication n°2 – “Quantitative gene expression profiling of mouse brain regions reveals differential transcripts conserved in man and affected in disease models”.	100
IV	Résultats complémentaires	142
IV.1	Hybridation in situ non-isotopique de marqueurs régionaux sur le cerveau de souris.....	142
IV.2	Expression des marqueurs dans le modèle du « rat 6OHDA » de la maladie de Parkinson 148	
IV.2.1	Evaluation de la dénervation dopaminergique induite par la 6-OHDA	148
IV.2.1.1	Analyse comportementale.....	148
IV.2.1.2	Contrôle histologique.....	148
IV.2.2	Effets de l'intoxication à la 6-OHDA sur l'expression des gènes dans la substance noire et le striatum	150
IV.2.2.1	Les transcrits mésencéphaliques	150
IV.2.2.2	Les transcrits striataux	150
V	Discussion	152
V.1	Gènes différenciellement exprimés.....	152
V.2	Classification fonctionnelle des transcrits présentant un enrichissement régional.....	153
V.3	Conservation des patterns d'expression chez l'homme	154
V.4	Expression génique dans le modèle R6/2.....	155
V.5	Expression génique dans les modèles « MPTP » et « 6-OHDA ».....	157
V.5.1	Altération des transcrits striataux dans le modèle « MPTP »	157
V.5.2	Altération des transcrits striataux dans le modèle « 6-OHDA ».....	157
V.5.3	Altération des transcrits mésencéphaliques dans le modèle « 6-OHDA »	158
V.6	Gènes régulés dans plusieurs modèles.....	160
CHAPITRE III – INACTIVATION D'Agpat4 CHEZ LA SOURIS 163		
I	Introduction	163
I.1	Données bibliographiques sur les 1-acylglycérol-3-phosphate O-acyltransférases.....	163
I.2	La stratégie Gene Trap, ou « piégeage » de gènes.	166
II	Resultats	168

II.1	<i>Profils d'expression des gènes de la famille Agpat dans les régions cérébrales.....</i>	168
II.2	<i>Génération de souris transgéniques hétérozygotes Agpat4+/- par « piégeage » de gène.</i>	169
II.3	<i>Expression d'Agpat4 au cours du développement embryonnaire.....</i>	169
III	Discussion	171
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES		173
ANNEXES.....		181
I	Dissection des régions cérébrales	181
II	Génération de la banque LongSADE de substance noire	183
II.1	<i>Purification des ARNm.....</i>	183
II.2	<i>Synthèse de l'ADNc et clivage par l'enzyme d'ancrage Sau3AI.</i>	183
II.3	<i>Quantification des ADNc synthétisés.....</i>	184
II.4	<i>Liaison des adaptateurs.</i>	185
II.5	<i>Clivage par l'enzyme d'étiquetage MmeI et formation des ditags.....</i>	187
II.6	<i>Amplification PCR.</i>	188
II.7	<i>Isolement et concaténation des ditags.</i>	192
II.8	<i>Purification et clonage des concatémères.....</i>	194
II.9	<i>Séquençage des concatémères.</i>	197
III	Hybridation <i>in situ</i>	198
III.1	<i>Synthèse des ribosondes.....</i>	198
III.2	<i>Préparation des tissus et des sections.....</i>	198
III.3	<i>Hybridation.....</i>	199
III.4	<i>Lavages post-hybridation.....</i>	199
III.5	<i>Révélation du marquage</i>	200
IV	Extraction d'ARN à partir de régions isolées.....	201
IV.1	<i>Préparation des solutions</i>	201
IV.2	<i>Protocole d'extraction</i>	201
V	RT-PCR quantitative.....	202
V.1	<i>Principe.....</i>	202
V.2	<i>Protocole.....</i>	203
VI	Intoxication des rats à la 6-hydroxydopamine.	205
VI.1	<i>Tests comportementaux.....</i>	205
VI.1.1	<i>Test du cylindre.....</i>	205
VI.1.2	<i>Test de rotation à l'apomorphine.....</i>	206
VI.2	<i>Immunohistochimie de la tyrosine hydroxylase.....</i>	207
VII	Génération de souris Agpat4+/-.....	208

FIGURES

Figure 1. Vue schématique de la technique des puces à ADNc.	18
Figure 2. Principe général de SAGE.	22
Figure 3. Représentation schématique de la méthode SAGE.	30
Figure 4. Vue schématique des applications de LongSAGE.	33
Figure 5. Vue schématique du striatum de primate.	39
Figure 6. Neurone de projection épineux de taille moyenne du striatum de rat.	40
Figure 7. Deux classes d'interneurones striataux.	41
Figure 8. Révélation de la structure « matrice – striosome » du striatum murin par localisation immunohistochimique des récepteurs opioïdes μ	42
Figure 9. Vue coronale schématique du globus pallidus chez le primate.	43
Figure 10. Illustration d'une coupe sagittale de la substance noire, montrant l'organisation des neurones dopaminergiques de la SNc et des neurones GABAergiques de la SNr.	45
Figure 11. Organisation topographique au sein des différentes structures des ganglions de la base chez le rat.	48
Figure 12. Distribution des neurones dopaminergiques mésencéphaliques projetant vers le striatum et les aires limbiques et corticales chez le primate.	50
Figure 13. Cellules à l'origine des voies méso-striées, méso-limbiques et méso-corticales chez le rat.	51
Figure 14. Illustration des principales afférences des ganglions de la base chez le primate.	53
Figure 15. Illustration des principales efférences des ganglions de la base chez le primate.	54
Figure 16. Illustration des circuits internes des ganglions de la base chez le primate.	57
Figure 17. Coupes coronales des cerveaux d'un individu normal et d'un individu atteint de la maladie de Huntington.	60
Figure 18. Modélisation de l'agrégation de la huntingtine mutée et de ses effets dans un neurone.	65
Figure 19. Neuropathologie de la maladie de Parkinson.	73
Figure 20. Structure moléculaire du MPP ⁺ et du paraquat.	75
Figure 21. Le mauvais repliement des protéines et la neurodégénérescence dans la maladie de Parkinson	79
Figure 22. Représentation schématique des mécanismes d'action du MPTP.	83
Figure 23. Structure moléculaire de la dopamine et de son analogue hydroxylé, la 6-hydroxydopamine.	86
Figure 24. Mécanismes potentiels de toxicité de la 6-hydroxydopamine.	87
Figure 25. Visualisation des ARNm de trois marqueurs du cortex préfrontal par hybridation <i>in situ</i>	143
Figure 26. Visualisation de l'ARNm de <i>3110035E14Rik</i> par hybridation <i>in situ</i>	144
Figure 27. Visualisation de deux ARNm enrichis dans le striatum par hybridation <i>in situ</i>	145
Figure 28. Visualisation de deux ARNm enrichis dans le thalamus par hybridation <i>in situ</i>	146

Figure 29. Visualisation de l'ARNm d' <i>Apat4</i> par hybridation <i>in situ</i>	147
Figure 30. Analyse comportementale des rats intoxiqués à la 6-OHDA.....	149
Figure 31. Contrôle de la dénervation dopaminergique.	149
Figure 32. Quantification par qRT-PCR des transcrits différenciellement distribués dans (a) la substance noire et (b) le striatum de rat traités à la 6-OHDA.	151
Figure 33. Transcrits enrichis dans le striatum dont l'expression est affectée dans plusieurs modèles de maladies neurodégénératives.	161
Figure 34. Voies de biosynthèse du triacylglycérol.....	164
Figure 35. Modélisation de la fonction d'AGPAT2 et de la signalisation par l'acide phosphatidique.	165
Figure 36. Type de construction utilisé. Exemple du vecteur pGT0lxf du Sanger Institute.....	167
Figure 37. Organisation des allèles sauvage et « piégé » d' <i>Apat4</i>	170
Figure 38. Expression d' <i>Apat4</i> chez l'embryon hétérozygote au stade E11.	170
Figure 39. Distribution différentielle de l'ARNm et de la protéine de <i>Rasgrp2</i> dans le cerveau de rat.	177
Figure 40. Position des lames dans la matrice pour la dissection des régions cérébrales.	182
Figure 41. Représentation des régions disséquées pour la génération des banques SAGE et la qRT-PCR.....	182
Figure 42. Séquences des adaptateurs A et B pour le protocole LongSADE.	186
Figure 43. Sites de restriction de l'enzyme <i>MmeI</i>	187
Figure 44. Détermination du nombre optimal de cycle pour l'amplification des ditags.	189
Figure 45: Purification du fragment d'intérêt de 132 pb sur un gel préparatif.....	189
Figure 46. Détermination du nombre optimal de cycles pour la réamplification des ditags.	190
Figure 47. Purification du fragment d'intérêt de 132 pb issu de la deuxième série de PCR.	190
Figure 48. Purification des ditags.	192
Figure 49. Quantification des ditags par la méthode « Ethidium Bromide DOT Quantitation ».	193
Figure 50. Profil de migration des produits de concaténation.	195
Figure 51. Vecteur pBluescript II SK (+/-).....	195
Figure 52. Dispositif expérimental du test du cylindre.....	206
Figure 53. Représentation schématique de la voie nigrostriée et des rotations contralatérales induites par l'apomorphine.....	206

TABLES

Table 1. Désordres comportementaux et symptômes des patients atteints de la maladie de Huntington	59
Table 2. Désordres comportementaux et symptômes des patients atteints de la maladie de Parkinson	71
Table 3. Principales caractéristiques des formes génétiques de la maladie de Parkinson.	77
Table 4. Caractéristiques générales des banques SADE et LongSADE.	96
Table 5. Tags « voisins » dont la séquence diffère de celle du tag canonique par un nucléotide.....	97
Table 6. Proportion de voisins par délétion du nucléotide 5' contenus dans l'ensemble des banques.	98
Table 7. Classification fonctionnelle des transcrits régulés en conditions physio-pathologiques.	162
Table 8. Abondance des tags des différentes <i>Agpat</i> dans les banques SAGE.	168
Table 9. Tags « antisens » enrichis dans la substance noire et l'aire tegmentale ventrale.....	176
Table 10. Quantité d'ADNc total calculée, et quantité d'adaptateurs utilisée en conséquence.....	186
Table 11. Efficacité de transformation des cellules compétentes XL10 gold par les concatémères clonés dans pBluescript II.....	196
Table 12. Coordonnées stéréotaxiques des sites d'injection de la 6-OHDA dans le FMT	205

LISTE DES ABREVIATIONS

6-OHDA	6-hydroxydopamine
Acb	Noyau Accumbens
ARR	Aire Rétro rubrale
ATV	Aire Tegmentale Ventrale
Cb	Cervelet
Cg	Cortex Cingulaire
CPu	Caudé-Putamen
Ent	Cortex Entorhinal
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GB	Ganglions de la base
GP	Globus Pallidus
GPe	Globus Pallidus externe
GPI	Globus Pallidus interne
Hip	Hippocampe
HIS	Hybridation <i>in situ</i>
M	Cortex Moteur
MH	Maladie de Huntington
MP	Maladie de Parkinson
MPTP	1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NST	Noyau Subthalamique
O	Cortex Orbitaire
PrL	Cortex Prélimbique
qRT-PCR	RT-PCR quantitative
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
S	Cortex Somesthésique
SADE	<i>SAGE Adaptation for Downsized Extract</i>
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SN	Substance noire
SNc	Substance noire compacte
SNr	Substance noire réticulée
Th	Thalamus
TH	Tyrosine Hydroxylase
WB	Cerveau Entier

REMERCIEMENTS

Je dois tout d'abord remercier Monique Bolotin qui, alors que je commençais à croire qu'il n'y avait pour moi aucun avenir professionnel possible, m'a donné la chance d'intégrer son DEA en septembre 2003. Merci d'avoir toujours cru en moi.

Cette année de DEA a été l'occasion de rencontrer Jean-Marc Elalouf, mon futur directeur de thèse. Merci Jean-Marc de m'avoir accueillie dans votre équipe et de m'avoir initiée à la SAGEsse. Il flottera longtemps un air d'*Anarchistes*... Je garderai aussi l'image de ce tronçon d'autoroute A6, où vous nous attendiez il n'y a pas si longtemps, mon bidon de liquide de refroidissement et moi, juché sur un talus et bravant la fureur des éléments.

Merci à tout le Laboratoire de PhysioGénomique : Michel de Chaldée, Marie-Claude Gaillard, Nicolas Caudy, qui m'ont « supportée » durant cette thèse, dans toutes les acceptions du terme.

Michel, je ne pourrai plus regarder un cryostat sans penser à la première journée que nous avons passée ensemble à actionner la manivelle de cette espèce d'orgue de barbarie-à-découper-le-cerveau, les mains gelées, nous évadant du taylorisme pour des voyages que nous avons faits, ou voulions faire, en Grèce, en Chine, au Moyen Orient...

Et puis il y a Marie-Claude, côtoyée longtemps à Saclay, rencontrée un peu tard à Vienne. Tu es une amie précieuse, attentive, d'une incomparable patience. Tu as subi sans broncher mes doutes, mes peines, mes grognements, mes sarcasmes...et mes montagnes de papiers, de post-it, de tasses sales, de bouteilles vides qui colonisaient peu à peu ton bureau, tes étagères, ton ordinateur, ta chaise...

Nicolas, merci pour ton optimisme, ton humeur égale et ta « papa-mobile » qui me fait toujours autant rigoler.

Merci aussi aux « nouveaux » du laboratoire : Benoît Bernay, Céline Bon, Laurie Galvan et Brendan Evano, pour votre bonne humeur et votre dynamisme.

Je tiens à remercier Emmanuel Brouillet et Elsa Diguët sans lesquels une partie de cette thèse ne serait pas née. Grâce à vous j'ai découvert à quel point mes conditions de travail pouvaient être agréables comparées aux heures que vous passez sans voir la lumière du jour dans les sous-sols du SHFJ.

Merci aux membres du Laboratoire de Transgénése d'avoir mis leur expertise au service de ma thèse. Je n'oublierai pas non plus les agréables dîners que nous avons partagés.

Evidemment, impossible de ne pas parler des autres, ceux des « labos d'à côté » : Cyril Esnault, Fred Beckouët, Max Wery, Marta Kwapisz, Gilles Lagniel. Je me souviendrai de nos conversations, de nos virées au « Christ » et à la « piscine »... Je sais que nous resterons en contact, même si l'Atlantique nous sépare.

Une pensée pour tous les participants au « séminaire du vendredi soir ». Merci tout d'abord à Benoît auquel revient la paternité de cette manifestation hebdomadaire. Je n'oublierai pas Willy, Céline, Emilie, Vivienne, Nayla, Emmanuelle, Hocine, Yad, Alexandra...

Merci à Monique Bolotin, Brigitte Kieffer, Gilbert Vassart et Tania Vitalis d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je remercie mes formidables amis, Jennifer, Agnès et Candido, pour leur soutien constant depuis des années. Merci Jennifer et Agnès d'avoir fait l'effort de relire ce manuscrit (oui, je sais, il y a plein de mots qui ne sont pas dans le dico, même en cherchant bien). Merci aussi à vous, Vincent, Alex, Jérémie pour les chouettes soirées passées en votre compagnie. Thierry, je te remercie de m'avoir encouragée et soutenue pendant toute la fin de ma thèse.

Enfin, merci à ma famille, sans laquelle je ne serais pas là aujourd'hui.

OBJECTIFS DE LA THESE

Mon travail de thèse a pour objectif d'améliorer la compréhension que nous avons de certaines régions spécialisées du cerveau en étudiant leur profil global d'expression génique, afin de découvrir de nouveaux gènes y étant spécifiquement exprimés et potentiellement régulés en conditions physiopathologiques.

La première partie de ma thèse (Chapitre I ; Publication n°1) est consacrée à la caractérisation d'un nouveau marqueur du striatum de souris, appelé *capucine*, dont l'identification découle d'une précédente analyse transcriptomique. Le but de cette étude était de cloner l'ADNc codant la Capucine et d'étudier sa distribution tissulaire de façon plus exhaustive, notamment par hybridation *in situ*. L'expression de protéines de fusion a également été analysée pour tenter de définir le compartiment cellulaire de destination de la protéine codée par le gène *capucine*. Par ailleurs, nous avons étudié la régulation de ce marqueur dans deux modèles de la maladie de Huntington, condition neurodégénérative qui affecte spécifiquement le striatum.

La deuxième partie de mon travail (Chapitre II ; Publication n°2) est dédiée à l'étude à grande échelle des profils d'expression des gènes dans 11 régions cérébrales. Cette analyse avait pour objectif de découvrir des gènes spécifiquement exprimés dans ces régions cérébrales, jusqu'alors inconnus comme tels. Nous nous sommes ensuite interrogés sur la conservation des patterns d'expression génique entre la souris et l'homme. Enfin, en postulant que l'expression spécifique des gènes dans une région est fonctionnellement pertinente, nous avons testé leur régulation dans les modèles animaux de deux conditions neurodégénératives, les maladies de Huntington et Parkinson. Ce chapitre contient également des résultats non-publiés, notamment l'expression des marqueurs du striatum et du mésencéphale ventral dans le modèle du rat intoxiqué à la 6-OHDA de la maladie de Parkinson, ainsi que l'étude de la distribution de quelques marqueurs par hybridation *in situ* sur coupes de cerveau de souris.

Enfin, une dernière partie (Chapitre III) aborde l'inactivation du gène *Agpat4*, dont nous avons montré par SAGE l'expression prédominante dans l'aire tegmentale ventrale.

Les annexes fournissent le protocole détaillé des différentes techniques utilisées, et particulièrement le protocole de génération d'une banque LongSADE, en prenant l'exemple de la substance noire.

I GENOMIQUE FONCTIONNELLE DU CERVEAU

Les avancées technologiques de ces dix dernières années, qui permettent d'analyser simultanément plusieurs milliers d'ARNm et de protéines, offrent la possibilité de disséquer des voies de signalisation et de mettre en évidence des réseaux de régulation en utilisant une approche intégrée (Ideker *et al.*, 2001). La génomique fonctionnelle est un outil important pour comprendre le fonctionnement du cerveau normal et pathologique, grâce à la description de patterns d'expression qui fournissent des indices sur les fonctions cellulaires, les mécanismes de régulation et les voies biochimiques. L'application de cette nouvelle façon d'appréhender un problème biologique aux maladies neurodégénératives humaines devrait aboutir à la redéfinition de ces maladies, en les classant selon des critères biochimiques plutôt que cliniques (Kurosinski *et al.*, 2002).

La génomique fonctionnelle regroupe deux approches principales : la transcriptomique et la protéomique. Ce chapitre aborde deux approches transcriptomiques majeures appliquées aux neurosciences : les puces à ADN et la méthode SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*). D'autres études à grande échelle utilisant l'hybridation *in situ* ou des lignées de souris transgéniques y sont également traitées, au même titre que certaines méthodes permettant l'analyse de types cellulaires spécifiques, comme la microdissection par capture laser (LCM), qui prend en considération l'extrême complexité cellulaire du cerveau.

Les avantages des méthodes d'étude des ARNm sont qu'elles sont en général moins difficiles, plus sensibles et impliquent des approches à plus haut débit que les méthodes d'étude des protéines. Par ailleurs, la mesure des ARNm apporte des informations directes sur l'état d'activation des gènes. De plus, la pertinence des approches transcriptomiques pour l'exploration fonctionnelle est démontrée, notamment par des études établissant une relation entre le transcriptome d'un tissu ou d'un organe et sa physiologie (Son *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004). Enfin, seule l'étude des transcriptomes permet de prendre en compte la population des ARN non-codants dont l'importance fonctionnelle est de plus en plus évidente (Kapranov *et al.*, 2007).

I.1 Les études par puces à ADN

I.1.1 Principe expérimental

Une des techniques les plus largement utilisées pour quantifier à grande échelle l'expression des gènes est celle des puces à ADN. Elle permet l'analyse simultanée de l'expression de plusieurs milliers de gènes (Schena *et al.*, 1995; Schena *et al.*, 1996). Bien que le terme général « puces à ADN » regroupe des approches techniques et méthodologiques distinctes, il désigne toujours une matrice ordonnée de plusieurs centaines à plusieurs milliers de séquences d'ADN immobilisées sur un support, le plus souvent en verre ou en silicone. Le principe de l'hybridation de deux séquences complémentaires d'acide nucléique est bien connu en biologie moléculaire, mais la technique des puces à ADN permet une analyse haut-débit de l'expression des gènes. Les ARN sont extraits et rétrotranscrits en ADNc, qui sont marqués avec un fluorochrome et hybridés aux séquences fixées sur la puce (*cf.* figure 1). Le signal de chaque *spot* est en principe proportionnel à la quantité d'un ARN spécifique dans l'échantillon d'origine.

Il existe en général deux types de puces : les puces comportant des oligonucléotides fixés ou directement synthétisés sur le support, et les puces composées d'ADNc sélectionnés ou de produits PCR. Les fragments d'acides nucléiques déposés sur les lames peuvent être des gènes déjà identifiés dans les bases de données, des ADNc, ou des ESTs (*expressed sequence tags*). Par ailleurs, il existe des puces à ADN comportant des sondes prédéfinies ou « à façon », commercialisées notamment par Affymetrix (25 mers ; 33 000 sondes / lame), Agilent (60 mers ; 41 000 sondes / lame), Amersham (30 mers ; 34 600 sondes / lame) ou encore Riken (pleine longueur ; 18 000 sondes / lame).

Comparés aux ADNc, les oligonucléotides permettent une hybridation plus spécifique mais requièrent de plus grandes quantités d'ARN pour l'hybridation, en raison d'une sensibilité réduite (Kane *et al.*, 2000).

I.1.2 Applications en neurobiologie

La technique des puces à ADN a été intensivement utilisée afin d'explorer fonctionnellement le cerveau. Plusieurs travaux ont été consacrés à l'identification de transcrits spécifiques d'une sous-région ou d'un sous-type cellulaire du cerveau normal.

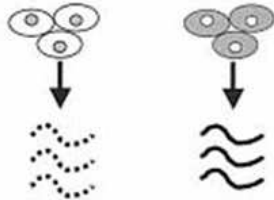
Différents modèles expérimentaux ont été explorés par les puces à ADN. Elles ont par exemple été utilisées pour étudier les différences de profils d'expression entre deux souches

de souris présentant des sensibilités différentes à l'épilepsie (Sandberg *et al.*, 2000). Ce travail a mis en évidence que dans une souche résistante à la mort cellulaire hippocampique induite par l'épilepsie (C57/BL6), la crise provoquait l'induction dans l'hippocampe d'un beaucoup plus grand nombre de gènes que dans la souche sensible à la mort cellulaire post-épilepsie (129SvEv). En parallèle, des différences d'expression génique entre plusieurs territoires cérébraux de chaque souche ont été révélées par les puces, puis validées par *northern blot* et RT-PCR quantitative. Les profils d'expression du cortex, du cervelet et du mésencéphale au sein de la même souche n'ont montré qu'une faible proportion de gènes (moins d'1%) présentant des niveaux d'expression significativement différents, avec la majorité des transcrits différentiels dans le cervelet. Une étude très similaire (Hovatta *et al.*, 2007) s'est récemment intéressée aux profils d'expression génique dans cinq régions (le noyau du lit de la strie terminale, l'hippocampe, l'hypothalamus, la substance grise périaqueducule et l'hypophyse) de six souches de souris (129S6/SvEvTac, A/J, C3H/HeJ, C57BL/6J, DBA/2J, et FVB/NJ). Les 45 000 sondes présentes sur la puce révèlent que 5% des gènes possèderaient un patron d'expression spécifique de la souche, alors qu'à la surprise des auteurs, une large proportion de gènes présenterait une expression régionalisée dans le cerveau (44%).

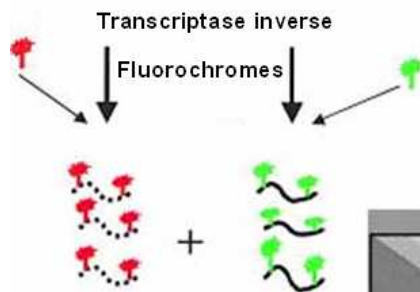
Plusieurs groupes ont identifié des gènes possédant des profils d'expression spécifiques à une sous-région cérébrale, comme les sous-régions hippocampiques (Zhao *et al.*, 2001), les noyaux amygdaloïdes (Zirlinger *et al.*, 2001), et plus récemment le striatum, l'hippocampe et le cortex (Ghate *et al.*, 2007). Dans cette dernière étude, l'analyse de l'expression de 24 000 gènes a abouti à l'identification de deux gènes non caractérisés préférentiellement exprimés dans le striatum, et qui pourraient donc être impliqués dans les fonctions spécifiques de cette région cérébrale. D'autres travaux récents ont été consacrés au profil d'expression d'environ 27 000 gènes dans 6 régions du cerveau de rat adulte (cortex frontomédian, temporal et occipital, hippocampe, striatum et cervelet) (Stansberg *et al.*, 2007). Les auteurs ont mis en évidence plusieurs ensembles de transcrits distincts montrant un enrichissement régional significatif, et dont l'annotation fonctionnelle montrerait une spécialisation des régions dans certains processus biologiques, comme la transmission synaptique dans le cortex, la neurogenèse dans l'hippocampe et la signalisation couplée aux protéines G dans le striatum.

A. Purification des ARN

Echantillon A Echantillon B

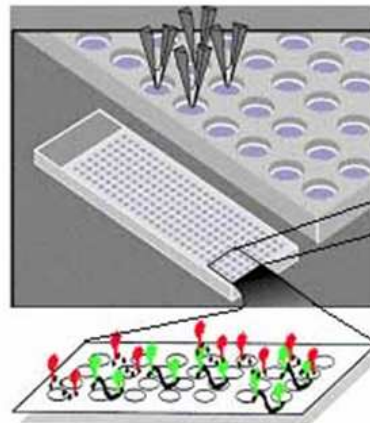


B. Synthèse d'ADNc et marquage des sondes



C. Hybridation sur la puce

→



D. Acquisition des images

● Echantillon A>B ● Echantillon A=B
● Echantillon B>A

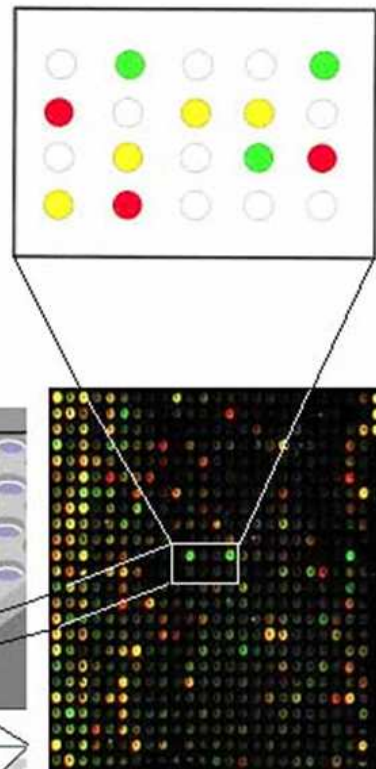


Figure 1. Vue schématique de la technique des puces à ADNc. Après extraction (A), les ARN de chaque échantillon sont rétrotranscrits en ADNc, marqués à l'aide d'un fluorochrome spécifique de chaque échantillon (B), puis mis en conditions d'hybridation sur la puce (C). La puce est alors scannée. La nature et l'intensité du signal, acquis et analysés par un logiciel spécialisé, permettent de comparer les abondances des différentes espèces moléculaires fixées sur la lame dans les échantillons A et B (D).

Enfin, il a été récemment mis en évidence que le cerveau de souris possédait une « empreinte » embryologique (Zapala *et al.*, 2005). Ce travail prouve l'existence d'un lien étroit entre les patterns d'expression génique et les origines embryonnaires des 24 tissus nerveux étudiés, c'est-à-dire l'existence d'un certain degré de conservation entre les profils d'expression des gènes lors de l'embryogénèse et à l'âge adulte. Plusieurs études se sont penchées sur la dimension temporelle de l'expression des gènes dans le cerveau au cours du développement embryonnaire de la souris et à des stades précoces après la naissance. En effet, la connaissance des patterns d'expression génique lors de la mise en place des structures cérébrales pourrait permettre de mieux comprendre leurs fonctions dans le cerveau adulte. Ainsi, l'analyse par micorarrays de l'expression de 12 000 gènes à 4 stades développementaux a mis en évidence environ 1 400 gènes différenciellement exprimés au cours du développement, dont l'un code une nouvelle protéine kinase putative, l'Ebr kinase (Matsuki *et al.*, 2005).

La technique des puces à ADN a également été abondamment utilisée pour explorer le cerveau dans un contexte pathologique.

Plusieurs études se sont intéressées aux changements intervenant dans le système nerveux central au cours du vieillissement et/ou de la neurodégénérescence en utilisant des tissus *post-mortem* de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Blalock *et al.*, 2004; Ginsberg *et al.*, 2000; Loring *et al.*, 2001; Mufson *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2003), ou encore des modèles animaux (Blalock *et al.*, 2003; Dickey *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2000a; Mirnics *et al.*, 2003; Prolla & Mattson, 2001). L'étude de l'hippocampe de 22 patients souffrant de cette maladie a notamment permis de mettre en évidence une activation des gènes impliqués dans les processus biologiques de différenciation et prolifération, dont des suppresseurs de tumeurs, des facteurs de croissance des oligodendrocytes et des modulateurs de la protéine kinase A (Blalock *et al.*, 2004).

Il n'existe qu'un nombre limité d'études transcriptomiques de la maladie de Huntington (MH) sur des cerveaux humains (Hodges *et al.*, 2006). De nombreuses études ont exploré l'expression des gènes dans des modèles de maladie de Huntington (MH), et ont ainsi mis en évidence un nombre considérable de gènes altérés dans leur expression. Ainsi, Luthi-Carter *et al.*, ont montré que 63% (184/293) des gènes exprimés dans le striatum et le cervelet qui sont régulés par l'expression de huntingtine mutante tronquée, montraient aussi des niveaux d'expression altérés dans un modèle murin d'atrophie dentato-rubro-pallidolusienne, une autre condition neurodégénérative provoquée par une expansion de glutamine dans le gène de l'atrophine1 (Luthi-Carter *et al.*, 2002b). Cette découverte corrobore l'hypothèse de

l'existence de mécanismes communs entre les maladies à expansion de glutamine. Au moins huit conditions de ce genre affectent l'homme, et il serait intéressant de les comparer entre elles de la même façon. Par ailleurs, selon Chan *et al.*, l'expression d'une huntingtine mutante entière a beaucoup moins d'effet sur l'expression des gènes que celle d'une protéine tronquée, ce qui suggère que le contexte de la protéine serait un aspect important de la neuropathologie de la maladie (Chan *et al.*, 2002). Enfin, l'étude récente chez la souris transgénique R6/1 (*cf.* IV.6.1), de la régulation de 54 gènes préférentiellement exprimés dans le striatum a montré la baisse de l'expression de 81% de ces gènes, ce qui tend à démontrer l'altération de fonctions spécifiques du striatum lors du processus pathologique (Desplats *et al.*, 2006).

L'application des puces à ADN à l'étude des profils d'expression géniques dans des tissus de patients atteints de la maladie de Parkinson (MP) devrait mettre en évidence des niveaux d'expression altérés pour les gènes liés à la vulnérabilité spécifique des neurones dopaminergiques dans cette maladie. Récemment, une analyse par puces à ADN à haute densité de l'expression des gènes dans la substance noire compacte (SNc) de patients parkinsoniens a révélé la régulation de 137 gènes, dont 68 réprimés et 69 induits (Grunblatt *et al.*, 2004). Les gènes réprimés codent des protéines impliquées dans la transduction du signal, la transmission dopaminergique, le transport des ions et le métabolisme énergétique. Un de ces gènes, SKP1, code une protéine impliquée dans la formation de l'E3 ubiquitine ligase et de plusieurs sous-unités du protéasome. La baisse d'activité de la voie ubiquitine-protéasome pourrait expliquer l'accumulation anormale de protéines comme l' α -synucléine qui est le principal composant des corps de Lewy. Cette étude a également mis en évidence l'activation de gènes impliqués dans des processus biologiques comme l'inflammation et le stress. Une autre étude par puces à ADN a comparé les signatures *post-mortem* de SNc de patients atteints de la MP, de paralysie supranucléaire progressive (PSP), de démence frontotemporale et parkinsonisme (DFTP) et de sujet sains (Hauser *et al.*, 2005). Ce travail a identifié 142 gènes différentiellement exprimés entre les patients atteints de la MP et les sujets sains, et 96 gènes pour les cas de PSP et DFTP comparés aux échantillons témoins. Les gènes codant les protéines de choc thermique HSPA1A et HSPA1B sont induits dans les trois pathologies, ce qui suggère une réponse commune de ces maladies pour tempérer les effets toxiques des protéines mal repliées. De plus, l'expression du gène PARK5 (codant l'ubiquitine carboxyle-terminal-hydrolase L1 et responsable d'une forme génétique de la MP) est divisée par deux chez les patients parkinsoniens, apportant un argument supplémentaire en faveur du rôle joué par le déficit de la voie ubiquitine-protéasome dans la MP. D'autres études ont utilisé des modèles de la MP pour explorer le rôle potentiel du stress oxydant, de l'inflammation et de

mécanismes inconnus dans la neurodégénérescence. Grünblatt *et al.*, ont notamment étudié le modèle MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine ; *cf.* V.6.1) de la MP par la technologie des puces à ADN. L'expression de 51 gènes impliqués dans l'inflammation, le stress oxydant, les voies du glutamate et des facteurs neurotrophiques, ainsi que dans des processus inconnus, était altérée par l'intoxication (Grunblatt *et al.*, 2001). Cette étude a identifié une série de « cascades » d'expression de gènes associée à l'administration de la neurotoxine, indiquant de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Les maladies neuropsychiatriques, caractérisées par des variations neurochimiques subtiles, sont probablement plus complexes à étudier par puces à ADN. Néanmoins, la technique a été utilisée à plusieurs reprises pour explorer la régulation génique dans la schizophrénie, en mettant notamment en évidence l'altération des gènes impliqués dans la fonction synaptique et le métabolisme dans le cortex préfrontal (Middleton *et al.*, 2005; Mirnics *et al.*, 2000; Tkachev *et al.*, 2003; Vawter *et al.*, 2004).

I.2 Les études par SAGE

I.2.1 Principe expérimental

La technique SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) a été décrite par Velculescu *et al.* en 1995 (Velculescu *et al.*, 1995). Cette méthode repose sur trois principes (*cf.* figure 2) : *i*) une séquence étiquette (tag) de 10 pb isolée à partir d'une région définie de l'ARNm est suffisamment informative pour identifier son transcrit d'origine ; *ii*) la concaténation de plusieurs tags en une seule molécule d'ADN linéaire permet une analyse plus efficace en diminuant et simplifiant les étapes de clonage et de séquençage ; *iii*) l'abondance de chaque tag est proportionnelle au niveau d'expression de son transcrit dans la population cellulaire d'origine.

I.2.2 Applications en neurobiologie

Comparativement aux puces à ADN, la méthode SAGE est considérablement moins employée pour étudier les transcriptomes, probablement en raison de la grande capacité de séquençage qu'elle requiert. Néanmoins, plusieurs études se sont intéressées à la question de la caractérisation par SAGE du transcriptome du cerveau normal, humain ou murin.

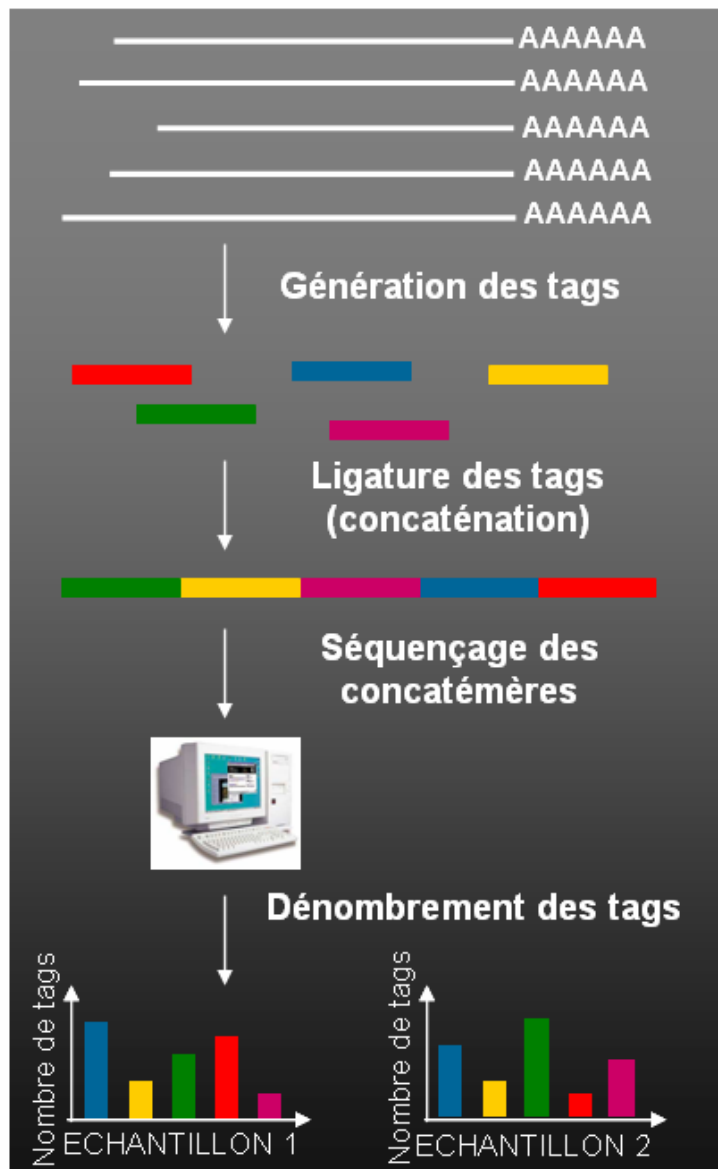


Figure 2. Principe général de SAGE. A partir de chaque ARNm est générée une étiquette, ou tag, qui possède une localisation précise sur le transcrit et une longueur suffisante pour en être spécifique. Les tags sont ensuite ligaturés les uns à la suite des autres pendant l'étape de concaténation. Après clonage, les concatémères sont séquencés, et les tags dénombrés. Pour chaque espèce d'ARNm, l'abondance de son tag spécifique est le reflet de son niveau d'expression dans l'échantillon dont il a été extrait.

Ainsi, une des premières études du transcriptome du cerveau entier de souris a été menée par SAGE. Chrast et collaborateurs ont utilisé la technique pour caractériser les profils d'expression génique du cerveau entier de la souris mâle, de la souris femelle, ainsi que d'un modèle murin Ts65Dn du syndrome de Down (Chrast *et al.*, 2000). Par ailleurs, le premier profil d'expression génique de l'hippocampe de rat a été établi par SAGE (Datson *et al.*, 2001). La comparaison de l'abondance des transcrits a montré que ceux codant les récepteurs du glutamate sont particulièrement abondants, ce qui est pertinent avec rôle important de la transmission glutamatergique dans cette région cérébrale, alors que les transcrits codant les récepteurs du GABA y sont 10 fois moins abondants. La méthode SAGE a été également utilisée pour caractériser le transcriptome de différentes régions cérébrales chez l'homme : la substance blanche, le thalamus et le cervelet. La spécificité de l'expression de plusieurs gènes (*neurogenic differentiation 1* ; *neurogranin* ; *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*) a été confirmée par PCR quantitative, et l'expression de nouveaux gènes a pu être détectée (Siu *et al.*, 2001). Chez la souris, l'analyse transcriptomique du striatum, du noyau accumbens et du cortex somatosensoriel a mis en évidence 135 transcrits distribués de façon hétérogène dans le cerveau, dont une large part correspond à de nouveaux marqueurs régionaux (de Chaldee *et al.*, 2003).

Par ailleurs, la comparaison des profils d'expression génique du néocortex de souris au 15^{ème} jour embryonnaire et au 1^{er} jour postnatal a mis en évidence des transcrits différentiellement exprimés qui correspondent à des gènes connus pour être impliqués dans le développement du néocortex (*e.g.*, *brain factor*, *neuroD2* et *Id2*), des gènes qui n'avaient pas encore été associés au développement néocortical (comme *brahma-related gene 1* ou *Evi9*), et des gènes d'identité ou de fonction inconnues (Gunnarsen *et al.*, 2002).

Enfin, la recherche de gènes différentiellement exprimés entre le cervelet de la souris adulte et celui de la souris âgée a mis en évidence trois transcrits non identifiés correspondant selon toute vraisemblance à de nouveaux gènes impliqués dans le processus de vieillissement cérébelleux (Popesco *et al.*, 2007).

En ce qui concerne les études SAGE du transcriptome cérébral en conditions pathologiques, elles sont pour l'essentiel consacrées au cancer (Boon *et al.*, 2004a; Michiels *et al.*, 1999). Une équipe a cependant appliqué la convergence génomique, qui combine l'expression génique à la liaison génétique, afin d'identifier des gènes candidats pour la maladie de Parkinson (Nouredine *et al.*, 2005). Trois banques de substance noire de cerveaux de patients parkinsoniens et deux banques témoins ont été générées par SAGE. Leur

analyse a permis d'identifier 402 gènes potentiellement impliqués dans des formes familiales de la maladie.

I.3 Les autres études

I.3.1 L'hybridation *in situ*

Les études à grande échelle qui utilisent la technique d'hybridation *in situ* se sont développées depuis quelques années, et sont à l'origine de plusieurs bases de données qui présentent chacune les patterns d'expression de milliers de gènes. Plusieurs études se sont penchées sur les profils d'expression génique au cours du développement de la souris (Christiansen *et al.*, 2006; Visel *et al.*, 2004), avec pour certaines, un intérêt particulier pour le cerveau. C'est notamment le cas de la base BGEM qui propose des images d'hybridation *in situ* pour 2 400 gènes, connus pour être exprimés dans le tissu nerveux ou impliqués dans des processus biologiques tels que la neurogenèse, à quatre stades développementaux du cerveau de souris : E11.5, E15.5, P7 et P42 (Magdaleno *et al.*, 2006). De la même façon, Gray et collaborateurs ont exploré le pattern spatiotemporel d'expression de 1174 gènes codant des facteurs de transcription dans le cerveau de souris aux stades E13.5 et P0 (Gray *et al.*, 2004). Apparû récemment, l'Allen Brain Atlas est la base de données d'hybridation *in situ* la plus exhaustive de l'expression des gènes dans le cerveau (Lein *et al.*, 2007), puisqu'elle propose les images de l'expression d'environ 20 000 gènes chez la souris adulte.

Bien que ces études fournissent des informations sur la distribution cellulaire, elles sont très coûteuses et fastidieuses (l'Allen Brain Institute a bénéficié d'un budget de 50 millions de dollars pour son étude). Une analyse complète de l'expression des gènes par ces techniques représente donc une lourde tâche. De plus, les données d'expression ne sont pas directement quantitatives (elles sont converties en intensité arbitraire par analyse d'image), ce qui rend difficile la comparaison des expressions de plusieurs gènes.

I.3.2 Le projet GENSAT

Une autre étude à grande échelle de l'expression des gènes dans le cerveau est basée sur l'utilisation de souris transgéniques exprimant des protéines fusionnées à l'EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) (Gong *et al.*, 2003). La stabilité du transgène pouvant varier en fonction du gène endogène, la technique mesure le niveau relatif de transcription de chaque gène mais ne mesure pas directement l'accumulation d'ARNm ou l'abondance de la

protéine du produit génique endogène. Cependant, cette technique est probablement plus sensible que l'hybridation *in situ* car certains vecteurs BAC contiennent plusieurs copies du transgène. La base de données fournit des informations d'expression pour trois stades développementaux- 15,5^{ème} jour in utero (E15.5), 7^{ème} jour après la naissance (P7), et adulte ; l'EGFP est visualisée grâce à un anticorps anti-EGFP ou directement en microscopie confocale. Cette méthode fournit des images d'expression détaillée, et permet de sélectionner, comme nous le mentionnons plus loin, des lignées intéressantes d'animaux transgéniques pour des études approfondies, y compris au niveau cellulaire (Lobo *et al.*, 2006).

I.3.3 Le MPSS

La technique du MPSS (*Massively Parallel Signature Sequencing*) est basée sur le séquençage parallèle de millions d'étiquettes d'ADNc générées à partir des ARNm.

Récemment, Jongeneel et collaborateurs ont généré environ 30 000 séquences « signatures » pour chacun des 32 tissus humains de leur étude, dont 8 tissus nerveux (amygdale, noyau caudé, cervelet, corps calleux, hypothalamus, thalamus, moelle épinière et cerveau fœtal) (Jongeneel *et al.*, 2005).

I.3.4 Analyses de l'expression sur cellules isolées

L'analyse de l'expression des gènes dans le cerveau est un véritable défi en raison de la haute complexité du tissu nerveux qui est constitué de nombreux noyaux possédant des systèmes de neurotransmission différents, plusieurs types de neurones et même plusieurs types de cellules non neuronales. Même les neurones appartenant à un même noyau et identiques morphologiquement possèdent des profils d'expression génique différents en fonction des afférences qu'ils reçoivent.

Plusieurs méthodes permettent désormais de s'affranchir du problème de l'hétérogénéité des tissus. Les technologies permettant l'analyse des ARNm de cellules isolées se sont développées depuis une dizaine d'années. Les deux méthodes les plus largement employées sont la dissection par microcapture laser (LCM) et la microaspiration. La LCM utilise un laser à haute énergie qui sépare les cellules d'intérêt du reste du tissu et facilite leur transfert dans un microtube pour l'analyse génétique (Bonner *et al.*, 1997; Emmert-Buck *et al.*, 1996). La microaspiration nécessite le couplage du microscope à un micromanipulateur et une micropompe. Il existe deux techniques : la première consiste à aspirer le cytosol des cellules par un patch-clamp sur cellule entière (Lambolez *et al.*, 1992),

la deuxième technique repose sur le *patch* et l'excision de chaque cellule à l'aide d'une microélectrode, ce qui permettrait la dissection des neurones avec un minimum de dommages (Ginsberg *et al.*, 2000; Hemby *et al.*, 2003). Le couplage de la microaspiration avec l'analyse par puces à ADN a permis notamment d'établir la taxonomie moléculaire de plusieurs classes de neurones corticaux, fournissant ainsi un outil pour classer les sous-types neuronaux inconnus (Sugino *et al.*, 2006).

Les techniques évoquées plus haut permettent l'analyse de cellules, mais fournissent des quantités limitées de matériel biologique. Lobo et collaborateurs ont récemment utilisé la technique du FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorting*) pour purifier des populations de neurones striataux. Des neurones striataux génétiquement marqués ont été disséqués sur des souris transgéniques du projet GENSAT, afin d'étudier leur profil d'expression génique par puces à ADN (Lobo *et al.*, 2006). Ainsi, plusieurs gènes différenciellement exprimés d'un sous-type cellulaire à l'autre ont pu être identifiés, dont le facteur de transcription Ebf1, spécifique des neurones de la voie striatonigrale.

Les études globales de l'expression de gènes sur cellules isolées ont pour ambition de comprendre les mécanismes moléculaires à l'échelle d'une seule cellule ou population cellulaire, dont une des applications pourrait être la mise au point d'agents pharmacologiques extrêmement spécifiques. Néanmoins, ces techniques se heurtent au problème de la quantité limitée de matériel biologique disponible, et passent systématiquement par une étape d'amplification des ARN, potentiellement génératrice d'un biais de quantification de l'expression génique.

I.3.5 La RT-PCR quantitative

Depuis son introduction dans les années 1980, la réaction de PCR a été modifiée et optimisée pour un nombre grandissant d'applications. A l'origine, cette méthode était destinée à l'amplification d'une molécule d'acide nucléique spécifique jusqu'à des quantités suffisantes pour l'identification ou la manipulation expérimentale. Puis, la technique de la PCR fut développée pour quantifier une espèce moléculaire précise dans un échantillon complexe. La PCR quantitative, plutôt que de simplement mesurer une quantité finale de produit, analyse l'accumulation des produits PCR au cours de la réaction. Le nombre de cycles nécessaires à la formation d'une quantité spécifique de produit (pendant la phase exponentielle d'amplification) est le reflet de la quantité de l'espèce moléculaire d'intérêt dans l'échantillon d'origine. Avec la RT-PCR quantitative (qRT-PCR), les échantillons

peuvent être analysés rapidement, et plusieurs transcrits peuvent être étudiés en parallèle (Aldape *et al.*, 2002). La détection directe d'un amplicon d'ADN double brin est réalisée par des méthodes chimiques utilisant des molécules fluorescentes intercalantes comme le SYBR Green. De tels colorants se fixent sur n'importe quel ADN amplifié, qu'il s'agisse d'un produit spécifique ou non, mais la spécificité de la réaction peut être contrôlée par la courbe de dissociation des produits PCR (voir matériel et méthode).

Cette technologie a été appliquée couramment pour étudier l'expression de quelques gènes dans le cerveau. Il ne s'agit donc pas à proprement parler d'une méthode d'analyse globale, mais la qRT-PCR est fréquemment adoptée pour valider les données générées par les technologies à grande échelle (Brooks *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2007; D'Agata & Cavallaro, 2003; Damodaran *et al.*, 2006; Rajeevan *et al.*, 2001; Torres-Munoz *et al.*, 2004). Signalons toutefois qu'elle a également été employée pour établir la carte d'expression de 756 facteurs de transcription, dans 11 régions du cerveau de souris (Suzuki *et al.*, 2004).

II CHOIX DE LA METHODE D'ANALYSE : SAGE

Le génome d'un mammifère comme la souris contient environ 22 000 gènes (Waterston *et al.*, 2002). La diversité des transcrits est environ 10 fois plus grande (Carninci *et al.*, 2005), en raison notamment des sites alternatifs d'épissage, de polyadénylation et d'initiation de la transcription. Chaque cellule contiendrait donc autour de 300 000 molécules d'ARNm correspondant à différentes espèces de transcrits présentes en quantités qui varient de quelques copies à plus de 10 000 copies par cellule (Hastie & Bishop, 1976). L'analyse des transcriptomes implique donc l'utilisation de méthodes capables d'étudier un grand nombre d'espèces moléculaires différentes, tout en couvrant des niveaux d'expression variant sur quatre ordres de grandeur.

La technique des puces à ADN est fondée sur la quantification de produits d'hybridation spécifiques. La performance de cette technique résulte de son pouvoir d'analyse parallèle de plusieurs milliers d'espèces moléculaires différentes. Par ailleurs, la sensibilité de la technique des puces à ADN est limitée à l'analyse de quantités de l'ordre de 5 µg d'ARN, ce qui représente environ 5 mg de tissus. Pour des structures anatomiques complexes comme le cerveau, où des régions adjacentes exercent des fonctions différentes, ceci pose un problème particulier dans la mesure où la quantité de tissu disponible est limitée. Des méthodes d'amplification des ARN basées sur la technique d'Eberwine (Van Gelder *et al.*, 1990) tentent de contourner le problème, mais risquent de fausser les abondances relatives car

tous les transcrits ne sont pas amplifiés de façon linéaire. De plus, lorsque l'on réalise une analyse par puces à ADN, il faut garder à l'esprit que cette technique nécessite de disposer au préalable d'une information de séquence et son évolution dépend donc grandement des avancées dans le séquençage et l'annotation des génomes. De plus, la quantification de l'expression d'un gène n'est pas absolue, mais est au contraire calculée relativement à un standard interne, ou au niveau d'expression du même gène dans un autre échantillon. Enfin, Les méthodes basées sur l'hybridation ne permettent pas de comparer de façon fiable les abondances d'ADNc différents au sein d'un même échantillon. À l'opposé, la technique *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) ne bénéficie pas des avantages des approches massivement parallèles, mais elle ne nécessite ni connaissance *a priori* sur la séquence des transcrits d'intérêt, ni équipement particulier, et permet une acquisition directe des données numériques. Pour ces raisons, nous avons choisi d'utiliser la méthode SAGE au laboratoire.

II.1 La méthode originale

Les étapes successives nécessaires à la constitution d'une banque SAGE sont schématisées sur la figure 3.

Les ARNm sont convertis en ADNc simple-brin en amorçant la transcription inverse au moyen d'oligo(dT) biotinylés. Après synthèse du second brin, les ADNc sont clivés par une enzyme de restriction (enzyme d'ancrage) susceptible de couper chaque transcrit au moins une fois. Les enzymes de restriction possédant un site de reconnaissance de 4pb sont typiquement utilisées, car elles coupent en moyenne tous les 256 pb (4^4) alors que la plupart des transcrits sont considérablement plus longs ; le protocole SAGE originel utilise Nla III, mais Sau3AI est également classiquement utilisée. La portion la plus en 3' de l'ADNc clivé est alors immobilisée par fixation sur des billes de streptavidine. Ce processus permet d'isoler la séquence comprise entre le site de restriction de l'enzyme d'ancrage le plus en 3' et la queue polyA de chaque transcrit. Les ADNc sont ensuite divisés en deux groupes distincts afin de lier leurs extrémités cohésives à des séquences d'adaptateurs : adaptateur A et adaptateur B respectivement pour chacun des groupes.

Les adaptateurs A et B contiennent deux séquences communes : une extrémité cohésive compatible avec l'extrémité libre des ADNc après digestion par l'enzyme d'ancrage, ainsi qu'un site de reconnaissance de l'enzyme d'étiquetage Bsm FI. Cette enzyme appartient à la famille des endonucléases de type IIS qui ont la particularité de couper jusqu'à 20 pb en

aval de leur site de reconnaissance. Les adaptateurs A et B possèdent chacun une séquence spécifique, située en 5' des deux sites de restriction précédents, et complémentaire des amorces de PCR utilisées lors des étapes ultérieures.

Les produits de ligature (ADNc + adaptateur) sont soumis à l'action de l'enzyme d'étiquetage. Les molécules libérées contiennent l'adaptateur (A ou B) et 9 pb d'ADNc. Les deux fractions sont alors mélangées et soumises à l'action de l'ADN ligase afin de générer des ditags.

Dans le but d'augmenter la quantité de matériel et de favoriser spécifiquement la construction désirée, une série de réactions de polymérisation en chaîne (PCR) est réalisée grâce aux amorces spécifiques à chaque adaptateur. L'amplification est effectuée sur des fragments de même taille, et avec le même couple d'amorces quelle que soit la nature du ditag. Cependant, certaines séquences de ditags peuvent être préférentiellement amplifiées et seront donc détectées plusieurs fois dans la banque. Velculescu *et al.* (1995) estiment que la probabilité pour deux tags d'être couplés dans le même ditag est faible, même pour les transcrits abondants. En conséquence, les ditags détectés plusieurs fois dans la banque ne sont comptés qu'une seule fois.

Les produits d'amplification sont ensuite clivés par l'enzyme d'ancrage pour permettre d'isoler les ditags. Les ditags purifiés sont ligaturés les uns à la suite des autres afin de former des concatémères, longs de plusieurs centaines de paires de bases et correspondant à une succession de ditags ponctués par les sites de restriction de l'enzyme d'ancrage. Les concatémères sont ensuite clonés, puis séquencés.

L'information de séquence peut être interprétée grâce à l'utilisation d'un certain nombre de logiciels (Velculescu *et al.*, 1995 ; Van Kampen *et al.*, 2000 ; Margulies *et al.*, 2000 ; Chabardès-Garonne *et al.*, 2003) qui permettent de repérer les sites de coupures de l'enzyme d'ancrage ayant l'espacement approprié, d'extraire les deux tags bornés par ces sites, de les trier, de les dénombrer, et éventuellement de les identifier.



II.2 Les développements de la méthode

De nombreuses améliorations ont été apportées à la méthode originale. Elles comprennent des modifications facilitant la construction des banques à partir de quelques dizaines de nanogrammes d'ARN totaux, et la génération de tags plus longs qui permettent une identification plus aisée des ADNc, ainsi que l'annotation des séquences génomiques.

II.2.1 Adaptation à l'étude de petits échantillons

Dès 1999, plusieurs modifications ont été apportées au protocole SAGE original pour permettre la génération de banques à partir de petits échantillons. Ces modifications tendent à limiter la perte de matériel au cours des différents stades du protocole. Dans certains cas, des étapes supplémentaires d'amplification sont également introduites pour disposer d'une quantité d'étiquettes compatible avec la construction d'une banque.

II.2.1.1 SADE, miniSAGE et microSAGE

Les adaptations SADE (*SAGE Adaptation for Downsized Extracts*) (Virlon *et al.*, 1999), miniSAGE (Ye *et al.*, 2000) et microSAGE (Datson *et al.*, 1999) présentent plusieurs modifications par rapport au protocole SAGE, et utilisent en particulier une stratégie d'extraction des ARNm plus performante, permettant d'étudier l'expression des gènes dans des échantillons de 50 000 cellules, soit 0,5 à 1 µg d'ARN total. Dans SADE, l'étape de purification des ARN totaux est supprimée, et les transcrits polyadénylés sont extraits directement à partir du lysat tissulaire grâce à leur hybridation sur des oligo(dT) liés de façon covalente à des billes magnétiques. MiniSAGE et microSAGE ont en commun l'utilisation du *mRNA capture kit* (Boehringer Mannheim) qui permet de réaliser les premières étapes de la génération d'une banque (de la purification des ARNm à la libération des tags) dans un tube unique. La méthode SADE est toujours employée (Chabardes-Garonne *et al.*, 2003; de Chaldee *et al.*, 2003), et est à l'origine d'un kit commercialisé par Invitrogen. En revanche, l'utilisation de miniSAGE et du microSAGE de Datson n'a pas été poursuivie pour la construction de banques.

II.2.1.2 SAGE-Lite et PCR-SAGE

SAGE-Lite (Peters *et al.*, 1999a) et PCR-SAGE (Neilson *et al.*, 2000) tirent partie de l'activité poly(C) transférase de la transcriptase inverse à la fin de la synthèse du brin d'ADN (système SMART, Clontech). Ceci permet une amplification PCR des ADNc avant de commencer la procédure SAGE. Les deux méthodes ont été utilisées pour générer des banques SAGE à partir de 900 pg d'ARN poly(A) extraits d'ovocytes humains pour PCR-SAGE (Neilson *et al.*, 2000), et de 50 ng d'ARN total extrait de tissu vasculaire-cérébral pour SAGE-Lite (Peters *et al.*, 1999a).

II.2.1.3 Small amplified RNA-SAGE (SAR-SAGE)

SAR-SAGE (Vilain *et al.*, 2003) est basé sur l'idée que l'amplification linéaire de fragments d'ARNm permet d'augmenter la quantité de matériel sans engendrer le biais introduit par une étape de PCR supplémentaire. L'approche consiste à greffer sur les ADNc, après digestion par l'enzyme d'ancrage, des adaptateurs contenant un promoteur transcriptionnel T7. Les ADNc sont alors transcrits en ARN qui sont à leur tour rétrotranscrits en ADNc. Cette procédure a été utilisée pour générer une banque à partir de 50 ng d'ARN total de thyroïde. Par ailleurs, la bonne corrélation existant entre la banque SAR-SAGE et une banque micro-SAGE générée à partir de 5 µg de la même préparation d'ARN, valide la pertinence de la méthode.

II.2.2 Annotation des tags

II.2.2.1 LongSAGE

Dans le but d'annoter le génome humain au moyen du transcriptome, le protocole SAGE original a été modifié de façon à générer des tags de 21pb (Saha *et al.*, 2002). Cette modification correspond à l'utilisation d'une autre enzyme d'étiquetage, Mme I.

L'obtention de tags plus longs permet en effet de les positionner directement sur le génome selon un alignement unique (en pratique, les auteurs trouvent un alignement unique pour environ 70% des tags de 21pb ; cf. figure 4). Pour la même raison, la génération de tags plus longs facilite l'identification des ADNc. Notons cependant que certains tags dont la séquence chevauche deux exons ne pourront pas être alignés sur les séquences génomiques.

L'analyse de plus de 8 millions de tags LongSAGE générés à partir de 72 banques de différents tissus murins, dont plusieurs régions cérébrales, révèle selon les auteurs 24 000 loci génomiques jamais décrits auparavant (Siddiqui *et al.*, 2005).

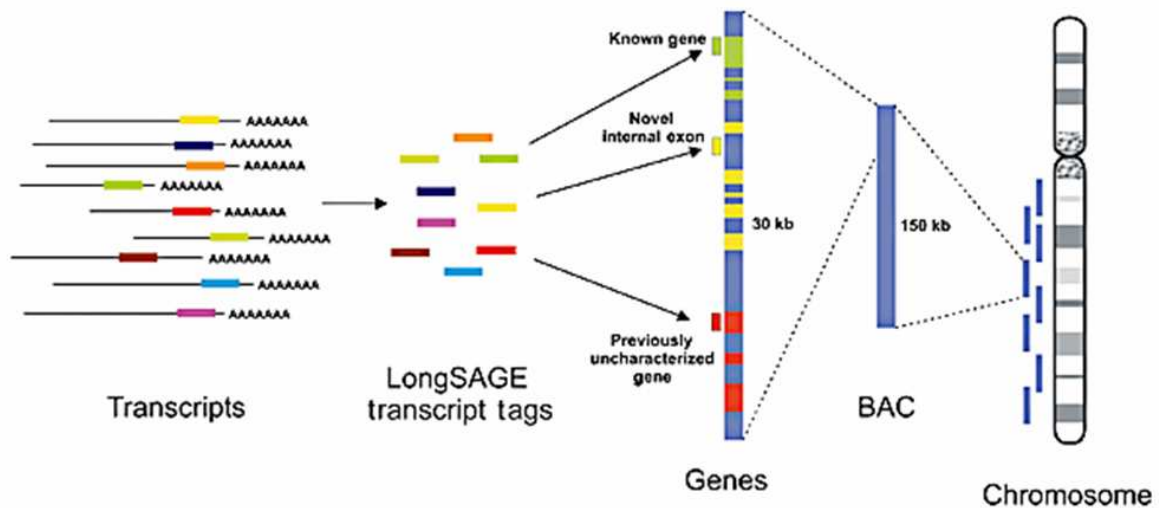


Figure 4. Vue schématique des applications de LongSAGE. Après génération de la banque, l'alignement des tags sur les séquences génomiques permet leur localisation précise sur le génome. La comparaison de la position des tags avec celle des gènes annotés fournit la preuve de l'expression du gène, et permet de découvrir de nouveaux exons ou de nouveaux gènes.

D'après Saha et al., 2002.

II.2.2.2 SuperSAGE

Le but de SuperSAGE est d'augmenter la spécificité des tags et de les utiliser directement comme sondes pour des puces à ADN (Matsumura *et al.*, 2006). L'utilisation d'une enzyme d'étiquetage de type III, EcoP151, permet la génération de tag SuperSAGE de 26 pb. Cette approche est particulièrement pertinente pour étudier l'expression génique dans des génomes pour lesquels on ne dispose pas d'EST ou qui n'ont pas été séquencés. SuperSAGE a été utilisé notamment pour caractériser les interactions hôte-pathogène chez la plante (Matsumura *et al.*, 2003).

II.2.2.3 *Generation of longer 3' cDNA from SAGE tags for gene identification (GLGI)*

Cette méthode a pour but d'augmenter la spécificité du tag SAGE (Chen *et al.*, 2002). Elle consiste à utiliser le tag en tant qu'amorce sens pour l'allonger sur l'extrémité 3' de l'ADNc. L'utilisation d'une amorce antisens universelle permet ensuite d'amplifier le fragment, transformant ainsi le tag SAGE en une EST de plusieurs centaines de nucléotides. Il s'agit donc simplement d'une variante de la méthode RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) appliquée aux extrémités 3' des ADNc.

II.2.3 Cap analysis of gene expression (CAGE)

Le but de CAGE est d'identifier les sites d'initiation de la transcription et les promoteurs (Kodzius *et al.*, 2006; Shiraki *et al.*, 2003). Des tags de 21 pb sont collectés des extrémités 5' des ADNc issus d'ARN purifiés à l'aide de leur coiffe. CAGE a été utilisé pour des études transcriptomiques chez l'homme et la souris (Carninci *et al.*, 2005).

II.2.4 *Paired-end ditag*

Cette procédure dérivée de SAGE vise à identifier les régions génomiques interagissant avec des protéines de fixation à l'ADN. Le principe du *paired-end ditag* est de collecter des tags aux deux extrémités des fragments d'ADN accrochés à des protéines spécifiques isolées par immunoprécipitation. La technique a notamment été utilisée pour identifier les sites de fixation de p53 sur le génome humain (Wei *et al.*, 2006) et constitue une alternative crédible à la technique du ChIP-on-chip (Ren *et al.*, 2000).

II.3 Avantages et limites

La méthode SAGE consiste en trois étapes principales : génération de la banque, séquençage des concatémères, puis traitement des informations de séquence. Cette technique permet de caractériser un transcriptome de façon descriptive ou différentielle sans disposer d'informations de séquence au préalable, et permet la découverte de nouveaux gènes ainsi que leur localisation sur le génome.

Une force majeure de la méthode SAGE est la possibilité d'analyser de façon simultanée et quantitative un grand nombre de gènes et même, en théorie, l'intégralité du transcriptome. La sensibilité et la fiabilité des résultats obtenus par SAGE ont été montrées de

nombreuses fois, notamment par des méthodes indépendantes d'analyse d'expression comme le criblage d'une banque d'ADNc (Velculescu *et al.*, 1995), le northern blot (Chrast *et al.*, 2000; Velculescu *et al.*, 1997), la RT-PCR quantitative (Hashimoto *et al.*, 2000), l'hybridation *in situ* (Datson *et al.*, 2001; Feldker *et al.*, 2003) et les puces à ADN (Ishii *et al.*, 2000; Nacht *et al.*, 1999). Un des autres atouts de SAGE est que les niveaux d'expression des transcrits sont représentés par un nombre absolu de tags ce qui facilite le partage et la comparaison des données entre différentes expériences et différents groupes de recherche, si l'on s'assure que les données sont issues du même organisme et que le nombre total de tags est pris en considération. A cette fin, les nombreuses données SAGE générées ces dix dernières années ont été collectées et déposées sur une base de données publique (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE>).

Bien que SAGE soit une technique puissante d'analyse de l'expression des gènes, elle possède certaines limites (Stollberg *et al.*, 2000 ; Yamamoto *et al.*, 2001). Premièrement, la construction de banques SAGE et le séquençage des concatémères sont coûteux en temps et en argent. Ensuite, bien que la profondeur d'analyse soit théoriquement infinie, l'étude de certains tissus complexes semble limitée aux transcrits d'abondance moyenne à haute (Datson *et al.*, 2001 ; Feldker *et al.*, 2003). Pour détecter des transcrits faiblement abondants, il faudrait séquencer environ trois « équivalents transcriptome », c'est-à-dire près d'un million de tags (Clarke & Carbon, 1976). De plus, certains transcrits ne possédant pas le site de coupure de l'enzyme d'ancrage échapperont à l'analyse. Enfin, les contraintes liées au caractère fastidieux de la construction des banques autant qu'à un accès en général limité au séquençage automatique bon marché ont limité l'utilisation de SAGE. Cependant, l'émergence récente de nouvelles méthodes de séquençage de l'ADN à très haut débit capable de déchiffrer jusqu'à 25 millions de bases en quelques heures (Margulies *et al.*, 2005) pourrait être à l'origine d'un regain d'intérêt pour SAGE.

De nombreuses études d'expression du génome se sont intéressées au cerveau. Toutefois, en raison de contraintes techniques et de la très grande hétérogénéité du cerveau, il n'existe à l'heure actuelle aucune analyse quantitative du transcriptome concernant des régions telles que le cortex prélimbique, le noyau accumbens, ou encore l'aire tegmentale ventrale. L'objectif de ce travail est d'explorer des régions jusqu'alors négligées par les études à grande échelle, mais surtout de caractériser le phénotype moléculaire de certaines

régions cérébrales avec un intérêt particulier pour le striatum et la substance noire, dont les neurones dégénèrent respectivement au cours de la maladie de Huntington et de la maladie de Parkinson. Ces deux régions appartiennent aux ganglions de la base (ou noyaux gris centraux) et sont à ce titre impliquées dans plusieurs boucles fonctionnelles participant à la mise en place et à l'exécution du mouvement volontaire.

III LES GANGLIONS DE LA BASE

Les ganglions de la base (GB) constituent les plus grands noyaux sous-corticaux du cerveau humain. Bien que le nombre de structures regroupées sous le terme de GB ait été sujet à de nombreuses controverses, il est généralement admis qu'ils comprennent le noyau caudé et le putamen (*corpus striatum*), le globus pallidus, la substance noire et le noyau subthalamique. Ces noyaux, fortement interconnectés, sont organisés en plusieurs boucles cortico - sous-corticales. Le dysfonctionnement des GB et des boucles fonctionnelles dans lesquelles ils sont engagés est à l'origine de troubles de la motricité tels que la maladie de Parkinson (caractérisée par une hypokinésie) et la maladie de Huntington (caractérisée par une hyperkinésie). Il est à noter cependant qu'il est de plus en plus évident que les GB ne sont pas les seules structures à intervenir dans la préparation, l'initiation ou l'exécution des mouvements volontaires, et que les fonctions cognitives et motivationnelles y contribuent également.

III.1 Evolution historique du concept de ganglions de la base

La première identification claire des ganglions de la base (basal ganglia) fut publiée en 1664 par l'anatomiste anglais Thomas Willis dans son texte fondateur sur le système nerveux central, *Cerebri Anatomie* (Willis *et al.*, 1964). Le terme de ganglions de la base n'y apparaît pas encore: les structures sous-corticales sont regroupées sous le terme de *corpus striatum*, qui comprend le noyau caudé et le putamen.

En 1876, le neurobiologiste anglais David Ferrier introduit le terme de *basal ganglia*, adapté du terme allemand *Stammganglion* proposé par Forel en 1872. Au cours du 20^{ème} siècle, « ganglions de la base » (encore appelés noyaux basaux ou noyaux gris centraux) fait référence au *corpus striatum* de Willis pour la plupart des neuroanatomistes.

Au début du 20^{ème} siècle, l'intérêt porté à ces structures fut accru par la découverte que leur lésion aboutissait souvent à une altération des fonctions motrices (Wilson, 1914). Vogt & Vogt publièrent en 1920 une description des connections existant entre le thalamus et le *corpus striatum* (Vogt & Vogt, 1920). L'accumulation des données concernant les ganglions de la base fut accompagnée par des controverses portant sur le nombre et la nature des structures qui en faisaient partie. Des régions du thalamus, de l'amygdale et du *claustrum*

furent intégrées aux ganglions de la base, avant l'apparition de la vision actuelle qui y inclue la substance noire et le noyau subthalamique.

III.2 Anatomie descriptive des ganglions de la base

Malgré leurs origines phylogénétiques et ontogéniques distinctes, ces noyaux font partie du même système fonctionnel qui naît dans le cortex, passe par le striatum, le pallidum et la substance noire, le thalamus, et retourne au cortex frontal ; le striatum constitue la voie d'entrée des GB (Carpenter, 1981). Il reçoit les informations de toutes les aires corticales et de nombreuses aires sous-corticales, incluant la plupart des systèmes neuromodulateurs. Ce chapitre est consacré à la description de chaque structure, avec une attention particulière pour le striatum et la substance noire.

III.2.1 Le striatum

Le terme « striatum » fut utilisé en premier par Vogt & Vogt en 1920 pour désigner l'ensemble telencéphalique formé par le noyau caudé et le putamen. Il est la plus grande composante des GB et est considéré comme la première étape d'intégration des GB.

Chez les primates, le putamen et le noyau caudé sont incomplètement séparés par la capsule interne (*cf.* figure 5). Les deux noyaux partagent des caractéristiques anatomiques et cytologiques et constituent un composé homogène (Georgopoulos, 1981). La tête du noyau caudé et le putamen sont liés par des ponts de matière grise (*pontes grisei caudatolenticularis*). Le nom de striatum provient de l'aspect strié de la capsule interne lorsqu'elle traverse ces noyaux. Chez les rongeurs, où il n'existe pas de séparation des deux structures par la capsule interne, on parle souvent de caudé-putamen ou striatum.

III.2.1.1 Subdivisions anatomiques

Le striatum est fonctionnellement divisé en striatum dorsal et ventral. Le striatum dorsal comprend la plus grande part du noyau caudé et du putamen, tandis que le striatum ventral est constitué par les parties médiane et ventrale du caudé-putamen ainsi que par le noyau accumbens adjacent et la partie striatale des bulbes olfactifs. Les aires allo- et periallocorticales projettent majoritairement sur le striatum ventral et les aires néocorticales projettent essentiellement sur le striatum dorsal (Lynd-Balta & Haber, 1994). C'est sur la base

de cette organisation régionale qu'a été introduite la dichotomie entre les régions striatales limbiques et non-limbiques (Heimer & Wilson, 1975).

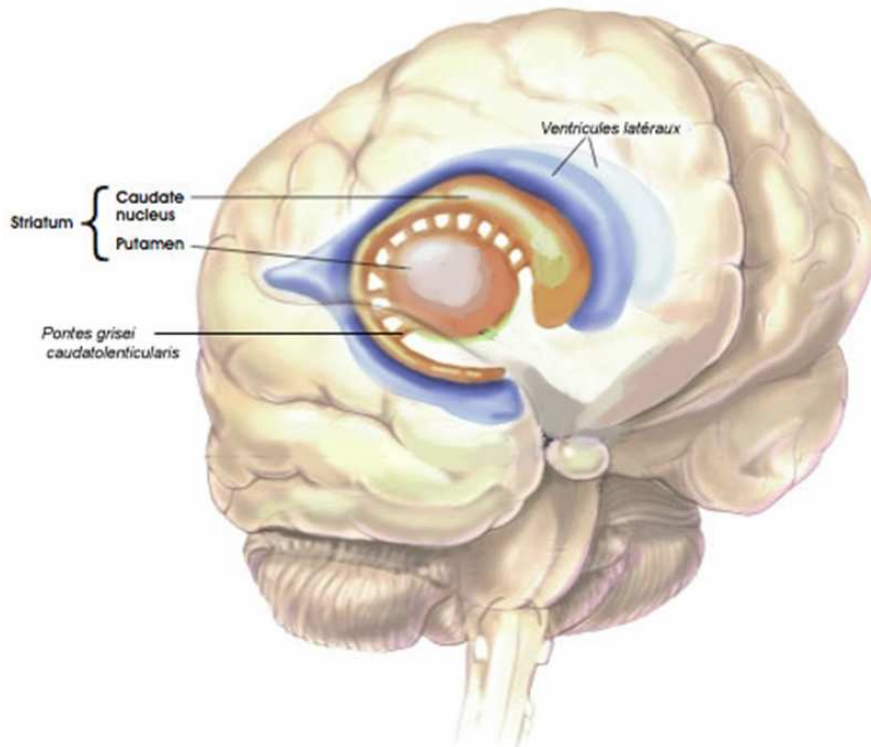


Figure 5. Vue schématique du striatum de primate. Le putamen et le noyau caudé sont incomplètement séparés par la capsule interne.

III.2.1.2 Cytologie

III.2.1.2.1 Les neurones de projection : les neurones épineux.

Le striatum est essentiellement constitué de neurones de projection, décrits à l'origine par Ramon y Cajal en 1911. Ils possèdent un corps cellulaire de taille moyenne (10 à 20 μm de diamètre), à partir duquel émergent 3 à 5 branches dendritiques primaires recouvertes d'épines (DiFiglia *et al.*, 1976). En raison de ces caractéristiques morphologiques, les neurones de projections ont été appelés neurones épineux. Par ailleurs, les axones de ces neurones émettent de nombreuses collatérales arborescentes qui contactent les autres neurones épineux (Kawaguchi *et al.*, 1990). Un exemple de ces neurones est donné en figure 6. Les neurones de projection striataux sont principalement GABAergiques (Smith *et al.*, 1987) et

peuvent être subdivisés en plusieurs populations d'après leurs caractéristiques neurochimiques (Bolam *et al.*, 1983).

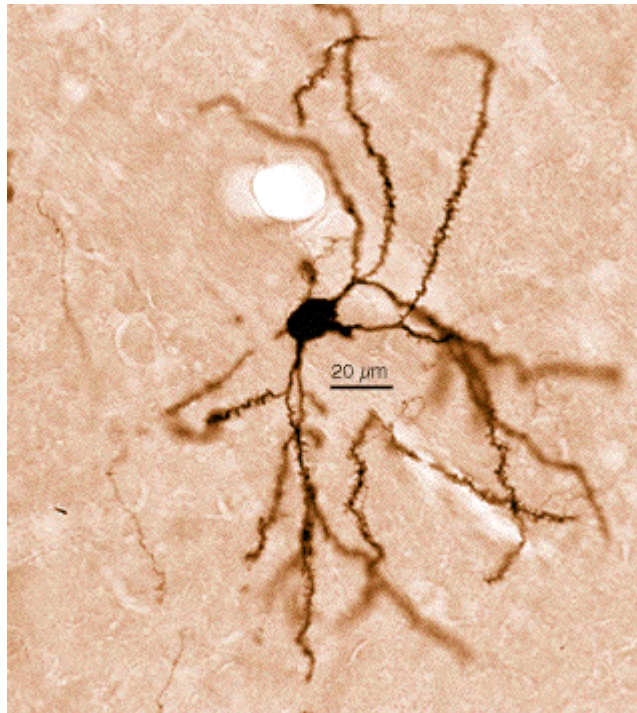


Figure 6. Neurone de projection épineux de taille moyenne du striatum de rat. Le neurone est visualisable après marquage intracellulaire à la biocytine. Les nombreuses épines dendritiques sont bien visibles.

D'après (Tepper et al., 1997).

III.2.1.2.2 Interneurones

Deux grandes catégories d'interneurones ont été identifiées sur la base du diamètre de leur corps cellulaire : les interneurones non-épineux géants et moyens (*cf.* figure 7).

Les interneurones non-épineux géants cholinergiques sont les plus connus. Ils possèdent un soma large, sphérique ou allongé (de 20 à 35 μm de diamètre chez le rat et le primate), à partir duquel irradient 2 à 5 dendrites (DiFiglia, 1987). Ils sont identifiables par leur contenu en choline acétyltransférase qui marque les neurones cholinergiques (DiFiglia, 1987). Ils représentent 1 à 2% de la population totale des neurones striataux et sont répartis de façon homogène au sein du striatum.

Les neurones non-épineux GABAergiques présentent un corps cellulaire de taille moyenne (10 à 30 μm), fusiforme ou polygonal. Il en existe trois types selon qu'ils coexpriment la parvalbumine (Kita *et al.*, 1990), la calrétinine (Bennett & Bolam, 1993) ou la

somatostatine. Les neurones à calrétinine sont principalement localisés dans le striatum dorso-médian, tandis que les neurones à parvalbumine sont plus nombreux dans la partie dorso-latérale. Ces derniers possèdent des axones dotés d'arborisations collatérales très denses (Kita *et al.*, 1990). Les interneurons non-épineux à somatostatine sont des cellules minoritaires qui possèdent un petit corps cellulaire (10 à 25 μm), contiennent le neuropeptide Y (Figueredo-Cardenas *et al.*, 1996) et sont répartis au sein du striatum selon un gradient dorso-ventral.

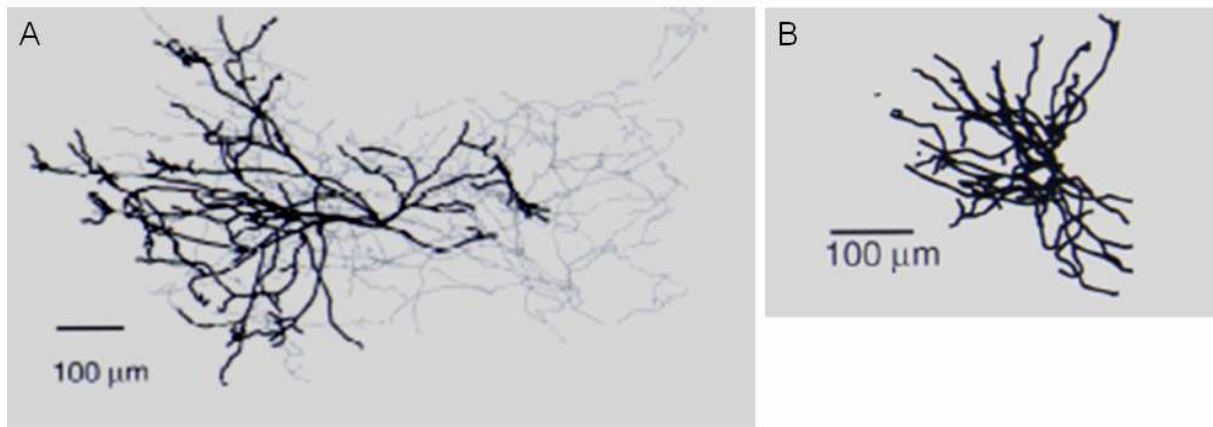


Figure 7. Deux classes d'interneurones striataux. A. Représentation de l'étendue des dendrites (noir) et des axones collatéraux (gris) d'un interneurone géant cholinergique. B. Représentation de l'étendue de l'arbre dendritique d'un interneurone moyen GABAergique.

D'après (Paxinos, 2004).

III.2.1.3 Les domaines fonctionnels : matrice et striosomes

C'est sur la base de données neurochimiques que le striatum a été divisé en deux compartiments : les striosomes et la matrice. Ces compartiments furent déterminés par l'intensité du marquage histochimique pour l'acétylcholinestérase chez le chat et le primate (Graybiel & Ragsdale, 1978), ainsi que par la distribution hétérogène des récepteurs opioïdes μ chez les rongeurs (Herkenham & Pert, 1981) (*cf.* figure 8). Cette compartimentation existe à la fois au niveau du striatum dorsal et ventral, à l'exception de la région *shell* du noyau accumbens (Voorn *et al.*, 1989).

Les striosomes qui occupent environ 15% du striatum, sont riches en récepteurs opioïdes μ , en récepteurs de la neurotensine et en récepteurs AMPA. Ils sont entourés par une matrice abondante riche en acétylcholinestérase, somatostatine et calbindine. Cette

architecture particulière donne au striatum une organisation modulaire qui est d'une certaine façon analogue à la structure en colonnes du cortex. Les neurones épineux respectent strictement les limites des compartiments striataux, en confinant leurs corps cellulaires et leur champ dendritique dans les striosomes ou dans la matrice. Les interneurons cholinergiques sont majoritairement localisés aux frontières des striosomes et de la matrice. Cette localisation préférentielle laisse supposer que ces interneurons permettent les interactions entre les projections striatales des deux compartiments (Aosaki *et al.*, 1995; Kawaguchi *et al.*, 1990). Il a été proposé que ces neurones puissent recevoir des afférences corticales, thalamiques et dopaminergiques (Wilson *et al.*, 1990) et soient impliqués dans la plasticité striatale.

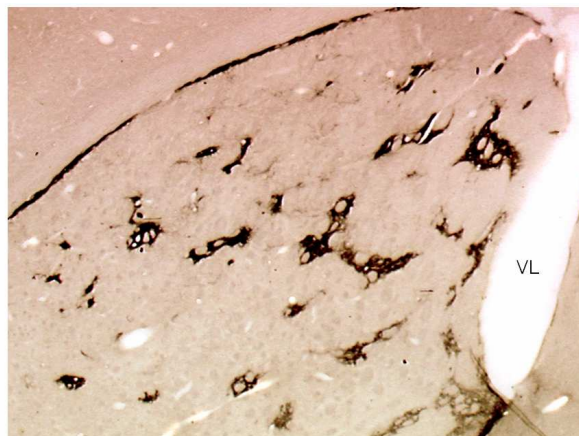


Figure 8. Révélation de la structure « matrice – striosome » du striatum murin par localisation immunohistochimique des récepteurs opioïdes μ . Le marquage des récepteurs (en noir) indique le compartiment « striosome » du striatum, tandis qu'une absence de marquage est constatée dans la matrice (VL : ventricule latéral).

D'après les ressources de l'Université Humbolt de Berlin.

III.2.2 Le noyau accumbens

Le noyau accumbens (Acb) fait partie de la boucle striato-pallido-thalamo-corticale (Alexander & Crutcher, 1990), mais reçoit également de nombreuses informations en provenance de diverses structures limbiques, qui incluent l'amygdale, l'hippocampe et le cortex préfrontal. Les principales voies efférentes de l'Acb projettent sur diverses structures cérébrales, connues pour leur capacité à réguler l'expression du comportement. Ainsi, il a été suggéré que l'Acb pourrait représenter une interface entre système limbique et système moteur (Mogenson *et al.*, 1980). D'un point de vue anatomique et neurochimique, l'Acb peut être sous-divisé en *core* (AcbC) et *shell* (AcbS) et le pattern de projection de ces deux noyaux

diffère : l'AcbC ressemble au striatum dorsal et projette majoritairement sur le pallidum ventral, alors que l'AcbS projette en plus sur différents sites effecteurs comme l'hypothalamus et la substance grise périaqueducale. L'innervation dopaminergique de l'Acb joue un rôle critique dans les propriétés motivationnelles d'abus des drogues et des stimuli qui leur sont associés, et participe ainsi à l'addiction (Berridge & Robinson, 1998).

III.2.3 Le Globus Pallidus

Le globus pallidus (GP) est une structure triangulaire située entre le putamen et le bras postérieur de la capsule interne. Il est traversé par de nombreuses fibres myélinisées, ce qui lui donne cette apparence caractéristique en coloration, à l'origine de son nom de « corps pâle ». Le terme de noyau « lenticulaire ou lentiforme » est parfois utilisé pour désigner l'ensemble putamen-GP, en raison de sa forme de lentille sur des coupes de cerveau.

Le GP se divise en trois domaines fonctionnels : le globus pallidus interne (GPi), externe (GPe), et le pallidum ventral (PV, partie antérieure du GP, située sous la commissure antérieure). Les populations neuronales de ces domaines sont extrêmement similaires, GABAergiques, et non différenciables pour la plus grande part (Carpenter, 1981). Chez l'homme, le GPe représente 70% du volume total du GP (Thorner *et al.*, 1975). Une représentation des deux principaux domaines fonctionnels du GP est donnée en figure 9. Chez les non-primates, le GPe et le GPi sont bien séparés et respectivement appelés pallidum et noyau entopédonculaire.

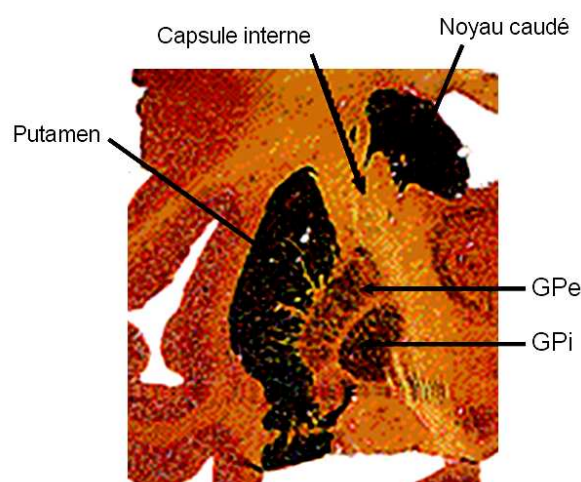


Figure 9. Vue coronale schématique du globus pallidus chez le primate. Le globus pallidus est situé entre le putamen et la capsule interne. Deux domaines fonctionnels sont visibles : le globus pallidus externe (GPe) et interne (GPi).

III.2.4 Le noyau subthalamique

Le noyau subthalamique est une structure biconvexe située entre la partie ventrale de la zona incerta et la partie dorsale des pédoncules cérébraux. Il fut découvert en 1865 par Jules Bernard Luys, et fut par la suite appelé corps de Luys par August Forel. Luys découvrit non seulement le noyau subthalamique (NST), mais fut également le premier à penser que cette structure était étroitement liée aux GB. Parmi les neurones des GB, ceux du NST sont les seuls à être excitateurs et à utiliser le glutamate comme neurotransmetteur.

III.2.5 La substance noire et les structures dopaminergiques du mésencéphale

III.2.5.1 La substance noire

La substance noire est le plus grand noyau mésencéphalique se situant dans le tegmentum ventral du mésencéphale. Elle se divise en deux parties qui possèdent des connexions et des neurotransmetteurs distincts : une partie ventrale à faible densité cellulaire, la *substantia nigra pars reticulata* (SNr), et une partie dorsale à haute densité cellulaire, la *substantia nigra pars compacta* (SNc).

La SNc est composée de grands neurones qui présentent, chez les primates, une pigmentation noire à l'origine du nom de la structure (substance noire ou *locus niger*). Les neurones de la SNc sont dopaminergiques et projettent principalement sur le striatum. Leurs caractéristiques chimiques et morphologiques sont détaillées en II.2.5.2.

Les neurones de la SNr projettent surtout sur le thalamus (noyau antérieur, ventral latéral et médiodorsal), mais aussi sur des noyaux du tronc cérébral (colliculus supérieur, noyau pédonculopontique), et sont GABAergiques. L'arbre dendritique de ces neurones est extrêmement étendu, et peut parfois couvrir 80 % de la longueur de la SNr et 70 % de sa largeur (Francois *et al.*, 1987). L'orientation du champ dendritique d'un neurone dépend de la position de celui-ci à l'intérieur de la structure. Les neurones de la partie dorsale de la SNr étendent leurs dendrites suivant les 3 axes alors que les neurones de la partie ventrale confinent leurs dendrites dans le plan ventral du noyau (*cf.* figure 10).

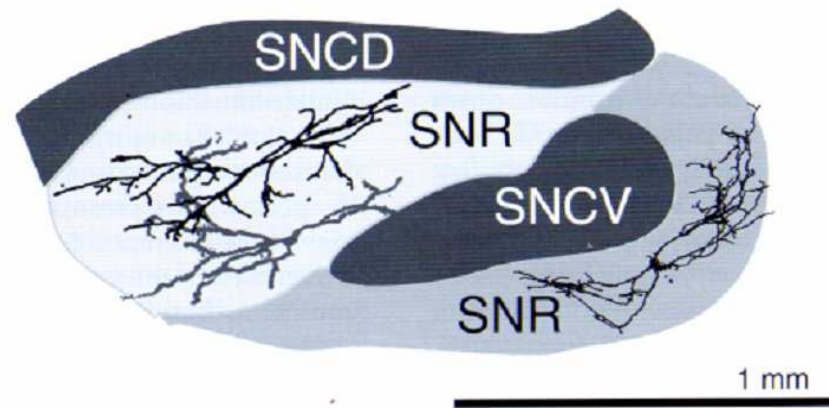


Figure 10. Illustration d'une coupe sagittale de la substance noire, montrant l'organisation des neurones dopaminergiques de la SNc et des neurones GABAergiques de la SNr. Les dendrites de la SNc ventrale (en gris) s'étendent dans SNr. Notez le champ dendritique des neurones de la SNr dorsale, qui s'étend dans les 3 dimensions de l'espace, alors que celles des neurones de la partie ventrale sont confinées dans le plan ventral du noyau. (SNCD: Substance Noire Compacte Dorsale; SNCV: Substance Noire Compacte Ventrale; SNR: Substance Noire Réticulée).

D'après (Paxinos, 2004).

III.2.5.2 Les structures dopaminergiques du mésencéphale

Le système dopaminergique mésencéphalique est le plus grand système dopaminergique cérébral. L'organisation des neurones dopaminergiques chez les primates et les rongeurs est globalement similaire. Tout d'abord décrit chez le rat (Dahlstrom & Fuxe, 1964), puis chez les primates non-humains (Felten *et al.*, 1974) et l'homme (Nobin & Björklund, 1973), le système dopaminergique mésencéphalique est composé de trois groupes cellulaires : l'aire rétro rubrale (ARR, groupe A8), la substance noire (quasi exclusivement la SNc, groupe A9) et l'aire tegmentale ventrale (ATV, groupe A10). Chez le rat, l'immunocytochimie de la tyrosine hydroxylase révèle environ 20 000 neurones mésencéphaliques dopaminergiques dans chaque hémisphère, dont 9 000 appartiennent à l'ATV (Björklund & Lindvall, 1984).

La division anatomique des cellules dopaminergiques en ensembles ventral et dorsal est supposée refléter des afférences et des caractéristiques morphologiques et chimiques différentes. Les neurones de l'ensemble dorsal possèdent des dendrites orientées selon un plan médiolatéral, et sont situés dans la région dorsale de la SNc, l'ATV et l'ARR. Une des

caractéristiques majeures de ces neurones est leur forte immunoréactivité pour la calbindine D-28K (CALB1) (Haber *et al.*, 1995). Les neurones de l'ensemble ventral sont organisés en deux sous-groupes (*cf.* figure 10) : *i*) une partie à forte densité cellulaire située dorsalement par rapport à la SNr ; *ii*) des colonnes de neurones dopaminergiques qui pénètrent profondément dans la SNr (Lewis & Sesack, 1997). Les neurones de la partie ventrale ne présentent pas de marquage CALB1 (Haber *et al.*, 1995). Chez le rat, les neurones contenant la calbindine projettent spécifiquement sur la matrice striatale, alors qu'au contraire, les neurones calbindine-négatifs innervent préférentiellement les striosomes (Gerfen *et al.*, 1987).

Une forte proportion de neurones dopaminergiques de la SNc médiane et de l'ATV contient de la cholecystokinine (CCK) et de la neurotensine (NT) (Kalivas, 1985). Bien que plus de 90% des neurones contenant de la NT contiennent également de la CCK, seuls 10 à 15% des neurones CCK-positifs contiennent de la NT. Les neurones dopaminergiques du mésencéphale qui contiennent l'une et/ou l'autre de ces deux protéines sont connus pour projeter sur le noyau accumbens, le cortex préfrontal et l'amygdale (Kalivas, 1985).

Les neurones de la substance noire (SN) font partie des ganglions de la base et projettent sur le striatum. Ils sont impliqués dans la régulation des mouvements volontaires et des réflexes. Les neurones de l'aire tegmentale ventrale (ATV), situés juste à côté de la SN, donnent naissance aux fibres dopaminergiques ascendantes mésolimbiques et mésocorticales en projetant de manière diffuse sur plusieurs structures corticales et sous-corticales. Les neurones de l'ATV sont connus pour jouer un rôle dans la mémoire, l'attention et la régulation des comportements addictifs ou émotifs. Une troisième population de neurones dopaminergiques mésencéphaliques se situe dans l'aire rétro-rubrale (ARR) et projette vers le striatum dorsal et la formation réticulée ; cette population de neurones est impliquée dans les mouvements orofaciaux. Il existe par ailleurs des connections entre les neurones dopaminergiques de SN/ATV et ceux de l'ARR.

III.3 Les afférences des ganglions de la base

Le circuit fonctionnel des GB est classiquement considéré comme une boucle cortico-corticale passant par le striatum, le pallidum et la substance noire, puis le thalamus. Le striatum est la structure d'entrée des GB. Le GPi et la SNr constituent quant à eux les principales voies de sortie des GB. Le striatum reçoit les projections de la quasi-totalité des régions corticales aussi bien que sous-corticales. Parmi ces différentes afférences, les

projections du cortex sont de loin les plus importantes et proviennent essentiellement du cortex ipsilatéral. En fonction de leur cible striatale, les projections proviennent de neurones situés dans les couches corticales supragranulaire ou infragranulaire (Gerfen, 1989). Ces projections corticales sont particulièrement intéressantes dans la mesure où elles semblent imposer au striatum un pattern d'organisation fonctionnelle conservé dans l'ensemble des GB (*cf.* figure 11).

III.3.1 Les projections cortico-striatales

Ces projections proviennent de l'ensemble du cortex (Gerfen & Wilson, 1996) et sont la principale source d'afférences du striatum (*cf.* figure 14).

Les fibres cortico-striées aboutissent principalement au niveau des épines dendritiques des neurones de projection du striatum dorsal et ventral (Dube *et al.*, 1988; Kemp & Powell, 1971). Ces projections sont excitatrices et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur (Christie *et al.*, 1987; Divac *et al.*, 1977; Fonnum *et al.*, 1981; Kitai, 1981).

Les projections cortico-striatales gagnent le striatum selon un système de projection topographiquement organisé. Ce système fut tout d'abord mis en évidence chez le rat (Webster, 1961), puis confirmé à plusieurs reprises dans d'autres espèces (Donoghue & Herkenham, 1986; Donoghue & Kitai, 1981; Gerfen, 1984). Succinctement, le cortex sensorimoteur projette sur le striatum dorsolatéral, le cortex visuel et auditif sur les parties médiane et dorso-médiane du striatum, et les aires méso- et allocorticales sur le striatum ventromédian, le noyau accumbens et le striatum ventral (*i.e.* les régions striatales des bulbes olfactifs) (McGeorge & Faull, 1989). L'organisation topographique des projections cortico-striatales respecte donc une régionalisation fonctionnelle. Différents modèles de fonctionnement des GB ont été proposés sur la base de cette organisation, sans qu'aucun ne soit néanmoins pleinement satisfaisant.

III.3.2 Les projections nigro-striatales

Des études antérieures ont décrit l'innervation catecholaminergique du télencéphale basal (Fallon & Moore, 1978; Moore, 1978). Ces études ont montré qu'alors que les projections noradrénergiques du tronc cérébral et du locus coeruleus vers le télencéphale basal ne présentent pas une topographie évidente, les projections dopaminergiques sont au contraire topographiquement organisées.

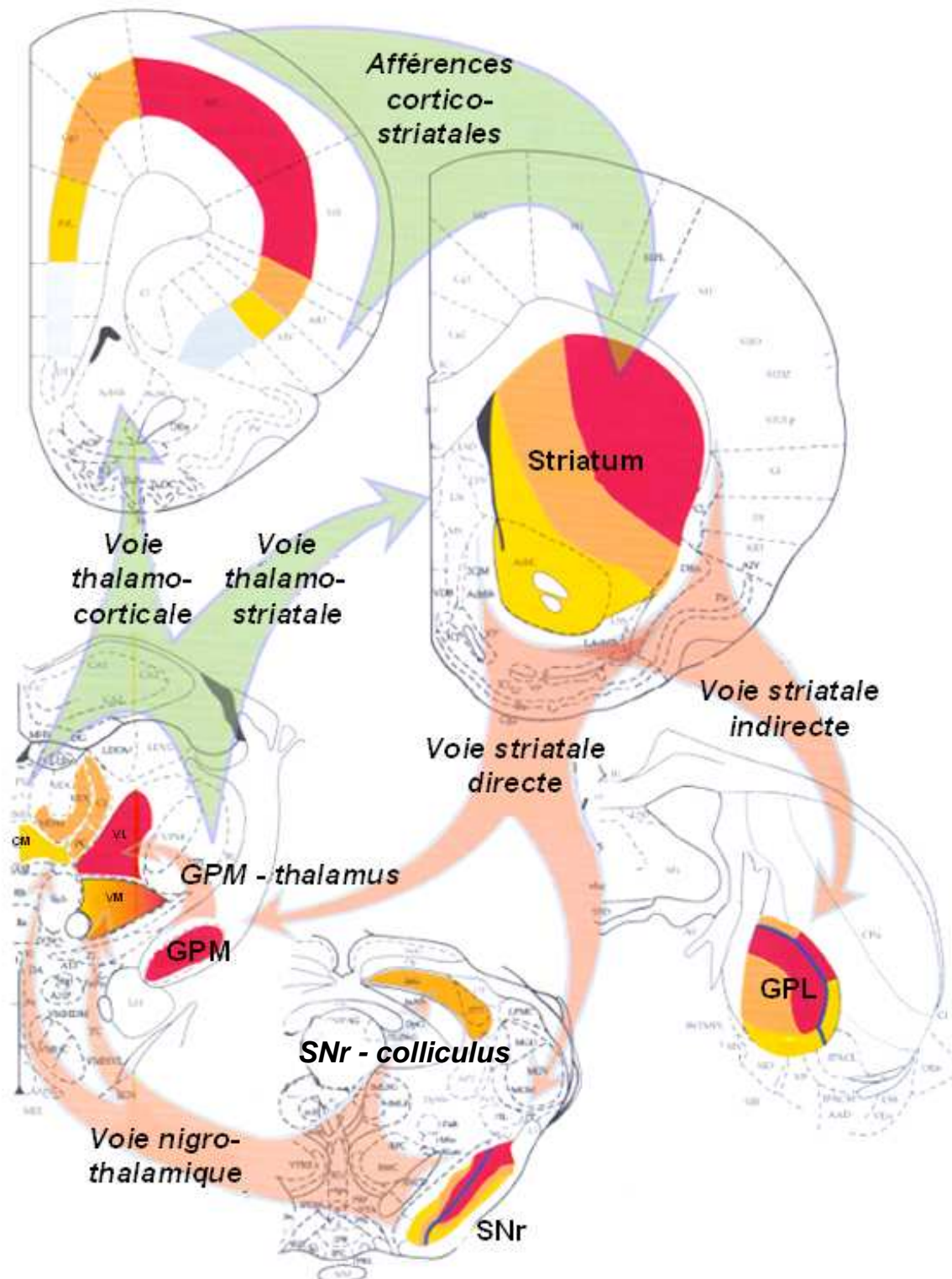


Figure 11. Organisation topographique au sein des différentes structures des ganglions de la base chez le rat.

GPL: globus pallidus latéral ; SNr: substance noire réticulée ; GPM: globus pallidus médian. Les flèches vertes indiquent les projections excitatrices glutamatergiques, tandis qu'en rose sont représentées les projections inhibitrices GABAergiques.

D'après (Paxinos, 2004).

L'organisation générale de ces projections vers le télencéphale se dessine en trois voies majeures : la voie nigrostriatale irradiant des aires A8 et A9 ; la voie mésolimbique prenant son origine dans l'aire A10 ; et la voie mésocorticale venant d'A10 et probablement d'A9.

Fallon et Moore (1978), ont étudié en détail les projections des neurones dopaminergiques mésencéphaliques à l'aide de trois méthodes. Premièrement, la localisation des corps cellulaires des neurones dopaminergiques fut déterminée par une adaptation de la technique histochimique de Falck-Hillarp (Lindvall & Bjorklund, 1974). Deuxièmement, le pattern de projection global de ces cellules fut analysé grâce à une méthode de traçage radioactif par transport antérograde (Cowan *et al.*, 1972), et troisièmement, la méthode du transport de la HRP (*horseradish peroxidase*) fut employée pour définir précisément la topographie de ces projections. La synthèse de ces résultats et de ceux obtenus dans des études antérieures (Fallon & Moore, 1978; Moore, 1978) permet d'établir une corrélation démontrant la topographie des projections des neurones mésencéphaliques dopaminergiques vers le cortex cérébral, le télencéphale basal et le striatum.

Les projections nigrostriatales proviennent des groupes de cellules dopaminergiques A9, A10 et A8. L'organisation de ces projections a été étudiée chez le singe (Haber & Fudge, 1997). Cette étude a abouti à trois conclusions majeures : *i*) le striatum sensori-moteur reçoit ses afférences dopaminergiques principales des colonnes cellulaires de la partie ventrale de la SNc ; *ii*) le striatum limbique est préférentiellement innervé par l'ATV et la partie dorsale de la SNc ; *iii*) le striatum associatif reçoit les afférences de neurones dopaminergiques situés majoritairement dans la région dense de la SNc ventrale (*cf.* figure 12). La situation est différente chez le rat où les neurones de la SNc dorsale projettent sur le striatum dorsal (Gerfen *et al.*, 1987) (*cf.* figure 13).

Chez le rat, deux types de fibres dopaminergiques ont été distingués en fonction de leur taille et de la fréquence des varicosités (Gerfen *et al.*, 1987). Le type le plus courant correspond à des axones lisses et fins avec peu de varicosités. Ces axones proviennent de l'ATV, l'ARR et de la partie ventrale de la SNc, et s'achèvent dans la matrice striatale. Le deuxième type de fibre est constitué d'axones légèrement plus fins avec des varicosités plus fréquentes et innervant spécifiquement les striosomes (Gerfen *et al.*, 1987).

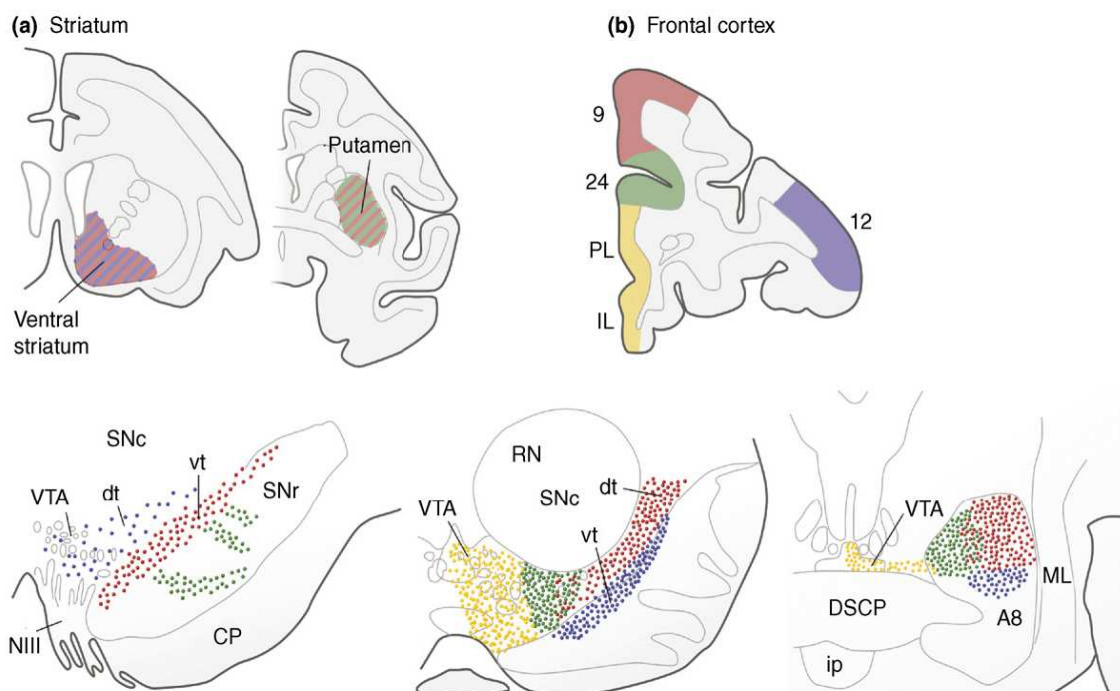


Figure 12. Distribution des neurones dopaminergiques mésencéphaliques projetant vers le striatum et les aires limbiques et corticales chez le primate. La confluence des cellules à l'origine des voies méso-striées, méso-limbiques et méso-corticales chez le primate est plus prononcée que chez le rat (comparer avec la figure 13). Les projections corticales dérivent de toutes les régions de l'ensemble des neurones dopaminergiques mésencéphaliques, et l'augmentation du nombre de neurones nigraux projetant sur le cortex est particulièrement frappante. Abréviations: CP, pédoncule cérébral; DSCP, décussation du pédoncule cérébelleux supérieur; dt, tiers ventral; IL, aire infralimbique du cortex frontal ip, noyau interpédunculaire; ML, lemniscus médian; NIII, sortie du nerf oculomoteur; PL, aire prélimbique du cortex frontal; RN, noyau rouge; vt, tiers ventral.

D'après (Bjorklund & Dunnett, 2007).

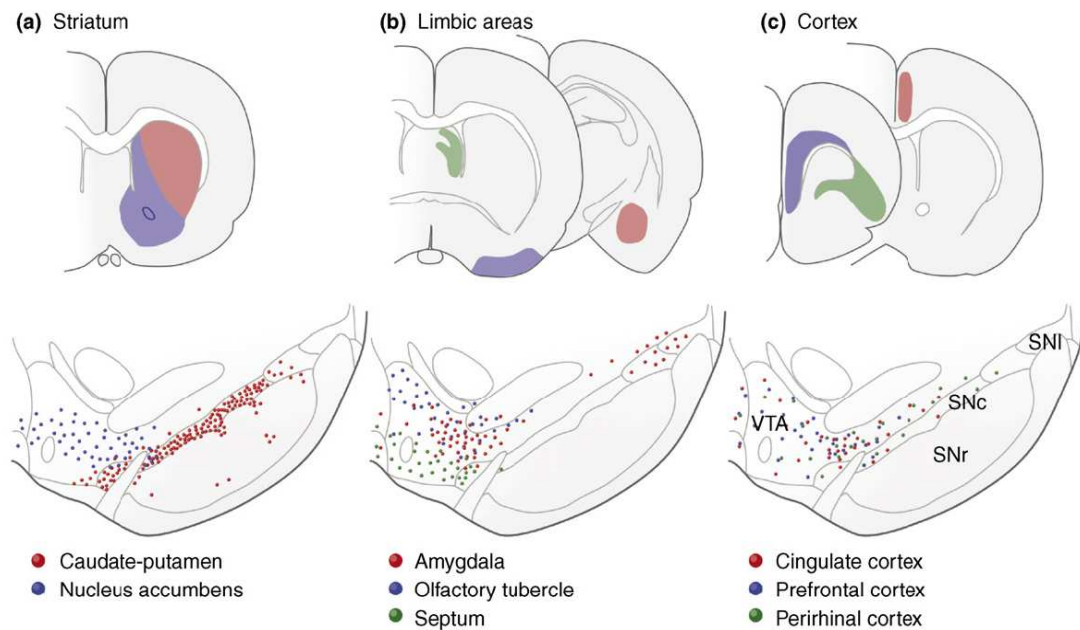


Figure 13. Cellules à l'origine des voies méso-striées, méso-limbiques et méso-corticales chez le rat. Les neurones dopaminergiques projetant vers (a) le striatum, les aires (b) limbiques et (c) corticales sont partiellement mélangés. Les cellules du tiers ventral de la SNc (points rouges en (a)) innervent probablement exclusivement, le territoire sensorimoteur du caudé-putamen (zone rouge en (a)), alors que les cellules du tiers dorsal comprennent des neurones qui projettent sur les régions limbiques (b) et corticales (c) du télencéphale. Abréviations : SNc, *substantia nigra pars compacta*; SNl, *substantia nigra pars lateralis*; SNr, *substantia nigra pars reticulata*; VTA, aire tegmentale ventrale.

D'après (Bjorklund & Dunnett, 2007).

Il existe cinq sous-types de récepteurs dopaminergiques dont chacun est représenté dans le striatum. Les récepteurs D1 et D2 sont présents sur les neurones épineux de projection des striatum dorsal et ventral, alors que les récepteurs D3 sont, quant à eux, confinés dans le striatum ventral limbique. Les ARNm des récepteurs D1 et D2 sont restreints à deux populations neuronales majeures : les neurones striato-nigraux à substance P, qui possèdent de nombreux récepteurs D1 et les neurones striatopallidaux à enképhaline, qui sont enrichis en récepteurs D2. Cependant, cette ségrégation n'est pas absolue et on trouve des neurones striataux qui contiennent les deux types de récepteurs dopaminergiques (Haber & Fudge, 1997). Dans le striatum ventral, les récepteurs D3 colocalisent partiellement avec D1 et D2 (Le Moine & Bloch, 1996). Par ailleurs, les interneurones cholinergiques du striatum expriment les récepteurs D2 et D5 (Bergson *et al.*, 1995; Le Moine *et al.*, 1990). Des quantités faibles de récepteurs D4 et D5 ont été observées dans des neurones striataux épineux dont les sites de projection demeurent inconnus (Bergson *et al.*, 1995; Mrzljak *et al.*, 1996).

Certaines études suggèrent que les neurones dopaminergiques de la SNc et de l'ATV innerveraient le globus pallidus, bien que moins massivement, et en particulier les segments internes, le pallidum ventral et le NST (Cossette *et al.*, 1999; Lindvall & Bjorklund, 1979). Une autre source non négligeable d'afférence dopaminergique des GB serait la libération dendritique de dopamine dans la SNr où des récepteurs dopaminergiques ont également été identifiés (Mrzljak *et al.*, 1996). Ainsi, les interactions entre les noyaux dopaminergiques du mésencéphale et les GB sont certainement bien plus importantes qu'on ne le pensait auparavant.

Par ailleurs, il est à noter qu'une petite partie de la voie nigrostriatale est non-dopaminergique et utilise le GABA comme neurotransmetteur. De plus, une projection mésocorticale GABAergique reliant l'ATV au cortex frontal a été mise en évidence chez le rat (Steffensen *et al.*, 1998).

III.3.3 Les projections thalamo-striatales

De la même façon que le cortex cérébral, le thalamus est une importante source d'afférences excitatrices pour le striatum (*cf.* figure 14). Ces projections sont presque exclusivement ipsilatérales et innervent la totalité du striatum, noyau accumbens inclus (Parent, 1986).

Les projections thalamiques vers le striatum sont majoritairement issues des noyaux intralaminaires (Cowan & Powell, 1956; Powell & Cowan, 1954), et plus particulièrement du

complexe centromédian parafasciculaire (Deschenes *et al.*, 1995). Ces projections sont topographiquement organisées : le noyau médiodorsal et le noyau parafasciculaire projettent majoritairement vers les territoires limbique et associatif du striatum, alors que les noyaux ventraux, centromédians et latéropostérieurs projettent sur le territoire sensorimoteur (Gimenez-Amaya *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1990).

III.3.4 Autres afférences striatales

Le cortex, la substance noire et le thalamus sont à l'origine des trois principales voies afférentes du striatum. D'autres projections, quantitativement mineures, ont cependant été mises en évidence.

Ainsi, l'amygdale envoie des afférences probablement excitatrices (Noda, 1968) topographiquement organisées. Cette structure appartenant au système limbique, il a été suggéré que ses projections vers le striatum étaient principalement dirigées vers le striatum limbique. Une étude chez le primate a montré que les efférences de l'amygdale étaient majoritairement dirigées sur la partie *shell* du noyau accumbens (Fudge *et al.*, 2002).

La sérotonine est un neuromédiateur présent à des concentrations relativement élevées dans le striatum, où elle est supposée exercer une action inhibitrice (Miller *et al.*, 1975; Olpe & Koella, 1977). Les fibres sérotoninergiques prennent naissance dans le noyau dorsal du raphé (Szabo, 1970), et innervent le striatum, la substance noire et le globus pallidus (Halliday *et al.*, 1995).

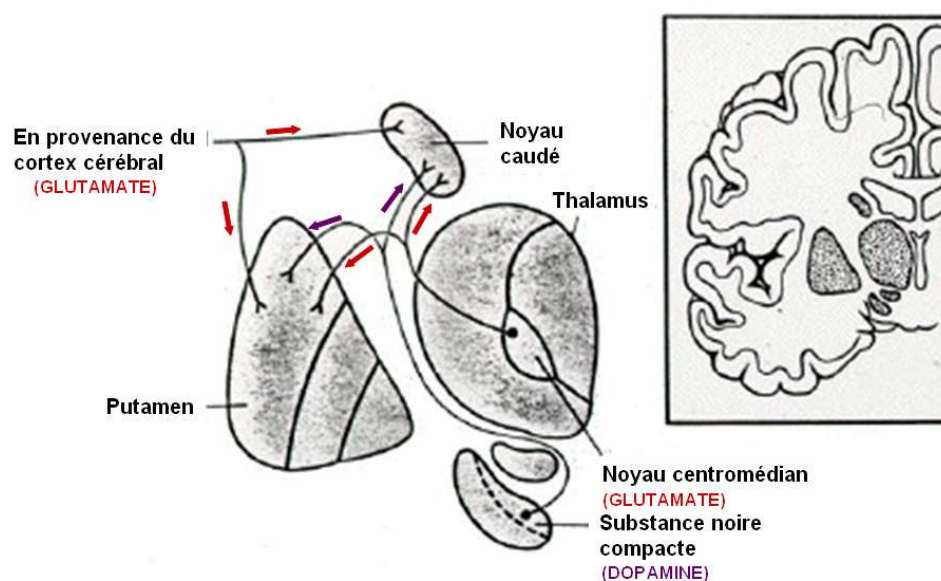


Figure 14. Illustration des principales afférences des ganglions de la base chez le primate.

III.4 Les voies de sortie et les boucles des ganglions de la base

Le GPi et la SNr sont les principales structures de sortie des ganglions de la base. Ils envoient leurs projections vers le thalamus, le colliculus supérieur et les noyaux prémoteurs du tronc cérébral.

Il a été longtemps suggéré que le GPi était innervé par le striatum moteur alors que la SNr l'était par le striatum associatif. Cependant, un autre point de vue propose que chaque région striatale innerve à la fois le GPi et la SNr (Alexander & Crutcher, 1990; Alexander *et al.*, 1990; Kawaguchi *et al.*, 1990). La région ventrale du GPi, qui reçoit les informations sensorimotrices du striatum, projette sur le noyau ventrolatéral et le noyau centromédian, alors que les régions du GPi innervées par le striatum associatif et limbique, projettent sur le noyau antéroventral parvocellulaire et la partie rostrale du noyau parafasciculaire (Sidibe *et al.*, 1997). Les différents noyaux thalamiques projettent en retour vers le cortex frontal, refermant ainsi la boucle (*cf.* figure 15).

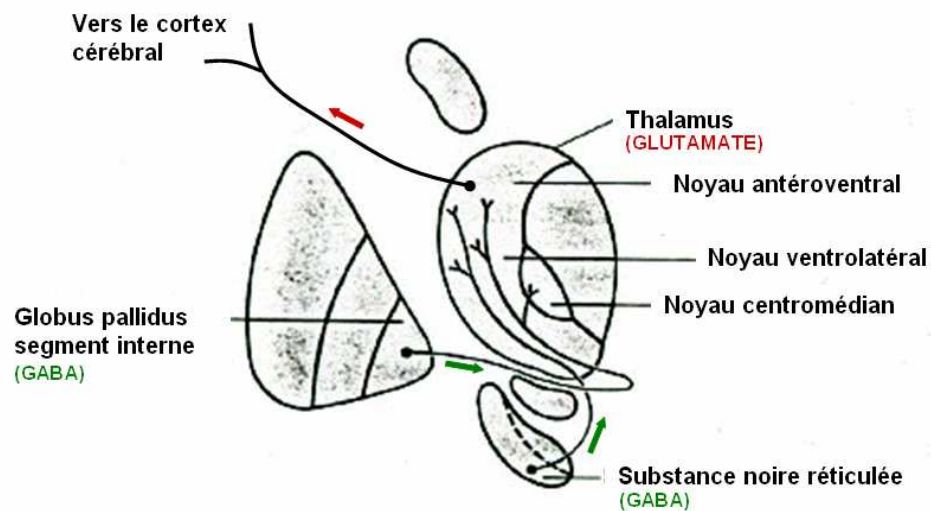


Figure 15. Illustration des principales efférences des ganglions de la base chez le primate.

III.5 Les circuits internes des ganglions de la base : les voies directe et indirecte

III.5.1 Le modèle classique

Sur la base de données anatomiques Albin et collaborateurs proposent en 1989 un modèle d'organisation des GB constitué de deux voies parallèles « directe » et « indirecte » (Albin *et al.*, 1989). Dans la voie directe, les neurones striataux GABAergiques inhibiteurs projettent directement sur les structures de sortie des GB, le GPi et la SNr. Dans la voie indirecte, globalement excitatrice, les neurones striataux projettent sur GPi/SNr *via* le GPe et le NST (*cf.* figure 16).

Selon ce schéma d'organisation, les propriétés fonctionnelles des GB sont liées aux influences opposées des circuits internes sur les structures de sortie. Ainsi, l'activation de la voie directe lève l'inhibition de la voie thalamo-corticale en inhibant les structures de sortie, et autorise donc l'expression des activités corticales. Ce processus est considéré comme central dans la physiologie des ganglions de la base et participerait à l'initiation du mouvement. A l'inverse, en exerçant un effet répressur sur l'expression des programmes moteurs, la voie indirecte participerait au contrôle de l'amplitude du mouvement. Il doit donc s'établir un équilibre subtil entre l'action inhibitrice de la voie directe et l'action excitatrice de la voie indirecte.

Cet équilibre est sous le contrôle des neurones dopaminergiques de la SNc. De nombreux travaux tendent à indiquer que les récepteurs dopaminergiques de type D1 sont préférentiellement localisés au niveau des corps cellulaires des neurones appartenant à la voie directe, tandis que les récepteurs D2 sont préférentiellement localisés sur les neurones striato-pallidaux appartenant à la voie indirecte (Gerfen *et al.*, 1990; Le Moine & Bloch, 1991; Le Moine & Bloch, 1995). L'activation des récepteurs D1 a un effet excitateur, alors que la mise en jeu des récepteurs D2 aboutit à une réduction de l'activité neuronale (Huff, 1996; Jensen *et al.*, 1996). La libération de dopamine dans le striatum aurait donc deux effets : l'activation des neurones de la voie directe et l'inhibition des neurones de la voie indirecte.

La ligne directrice de ce modèle (*i.e.* le déséquilibre entre les activités des voies directe et indirecte) permet de rendre compte des mécanismes pathologiques mis en jeu dans les troubles hyper- ou hypokinétiques (Albin *et al.*, 1989; DeLong, 1990). Lors de la maladie de Parkinson, la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriatale provoquerait donc à la fois une activation des efférences striatales vers le GPe et une

inhibition des projections striatales vers GPi/SNr (Albin *et al.*, 1989). Dans ce modèle, l'inhibition du GPe entraîne la levée de l'inhibition qu'il exerce sur le NST. La hausse de l'activité de ce dernier contribue à augmenter l'action inhibitrice du GPi et de la SNr sur le thalamus, conduisant finalement à l'inhibition des projections thalamo-corticales (Alexander & Crutcher, 1990). Cette hypothèse est renforcée par l'augmentation des fréquences de décharge du NST et du GPi observée dans la maladie de Parkinson (DeLong, 1990).

III.5.2 La remise en cause du modèle classique

III.5.2.1 Structures d'entrée et de sortie

Plusieurs études ont rapporté l'existence de voies excitatrices directes entre le cortex et le NST (Bevan & Bolam, 1995; Maurice *et al.*, 1998; Nambu *et al.*, 1996). De plus, certains neurones corticaux innerveraient à la fois le striatum et le NST (Parent & Hazrati, 1995a; Parent & Hazrati, 1995b). Le NST peut donc être considéré comme une structure d'entrée des GB, au même titre que le striatum. Finalement, les GB seraient un circuit à double entrée : une entrée striatale inhibitrice, et une entrée subthalamique excitatrice.

Bien que le GPi et la SNr soient les principales structures de sortie des ganglions de la base, des projections directes du GPe vers le thalamus ont également été décrites, suggérant que cette structure pourrait influencer les fonctions motrices indépendamment des structures de sortie (Parent & Hazrati, 1995a; Parent & Hazrati, 1995b)

III.5.2.2 Voies directe et indirecte

En dépit des nombreuses données corroborant le modèle d'Albin et DeLong, des découvertes assez récentes semblent incompatibles avec le modèle dualiste actuel des GB. En effet, certains neurones des GB possèdent de larges connectivités collatérales (Parent *et al.*, 2000).

De plus, une colocalisation des récepteurs D1 et D2 dans les neurones striataux a été mise en évidence (Aizman *et al.*, 2000), ce qui suggère que les neurones striataux qui projettent sur le GPi pourraient potentiellement projeter aussi sur le GPe (Wu *et al.*, 2000). Wu et collaborateurs (2000) ont divisé les neurones striataux en trois sous-types en se basant sur des données anatomiques : *i*) les neurones épineux moyens de type I qui projettent uniquement sur le GPe ; *ii*) les neurones épineux moyens de type II qui projettent à la fois sur GPe et SNr ; *iii*) les neurones épineux moyens de type III qui projettent sur GPe, GPi et SNr.

Le GPe ne serait pas ainsi une simple structure relais de la voie indirecte, mais bel et bien une structure intégrative.

Enfin, contrairement à ce que pourrait suggérer le modèle classique, une lésion du GPi ne se contente pas d'améliorer les caractéristiques hypokinétiques de la MP, mais allège également les désordres hyperkinétiques, et les lésions du thalamus ne conduisent pas à un syndrome parkinsonien. Il y a donc de plus en plus d'arguments permettant de remettre en cause le modèle classique d'Albin.

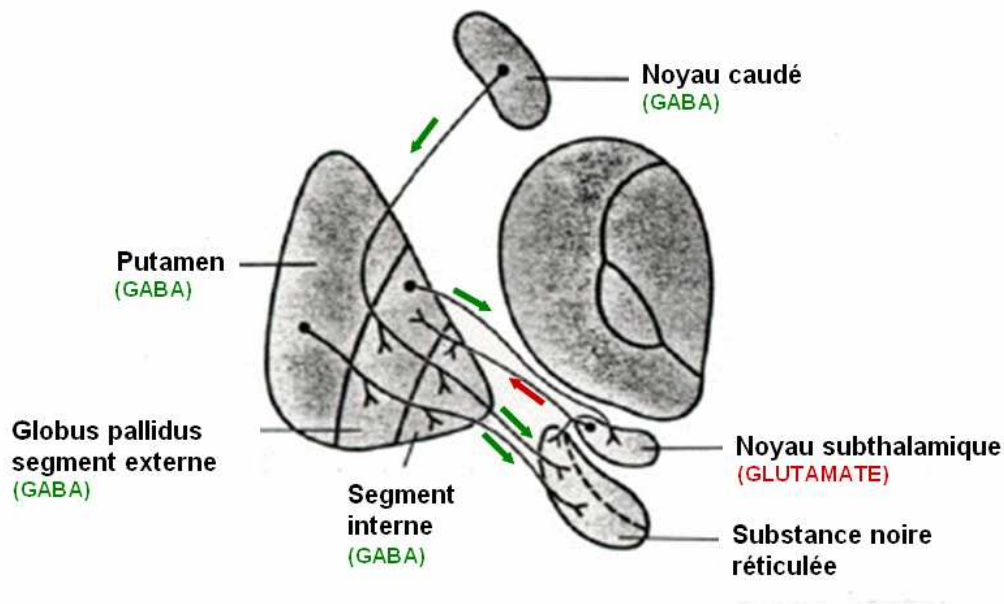


Figure 16. Illustration des circuits internes des ganglions de la base chez le primate. Dans la voie directe, les neurones striataux projettent directement sur le segment interne du globus pallidus (GPi) et la substance noire réticulée (SNr). Dans la voie indirecte, les neurones striataux projettent sur le GPi et la SNr *via* le noyau subthalamique.

IV LA MALADIE DE HUNTINGTON

IV.1 Caractéristiques cliniques

Le caractère héréditaire de la chorée fut noté par de nombreux médecins du début du 19^{ème} siècle, mais la description détaillée qu'en fit George Huntington a conduit à la désignation éponyme de la maladie (Huntington, 1872).

Bien que l'âge moyen de déclaration de la maladie de Huntington se situe entre 30 et 40 ans, les individus atteints peuvent devenir symptomatiques dès l'âge d'1 an et jusqu'à celui de 80. Avant ce stade, ils sont en pleine santé et n'ont pas d'anomalie clinique détectable (Myers, 2004). Cette période saine est difficile à distinguer de la phase pré-diagnostique au cours de laquelle les patients sont victimes de légers troubles de la personnalité, de la cognition et du contrôle moteur. Le diagnostic de la maladie est réalisé lorsque les symptômes sont suffisamment développés et spécifiques (Paulsen *et al.*, 2005). Dans la phase pré-diagnostique, les patients deviennent irritables, désinhibés et inaptes au travail. Il leur devient difficile d'effectuer plusieurs tâches simultanées et les pertes de mémoire et l'anxiété deviennent de plus en plus importantes. Les patients présentent un état de grande agitation et une incapacité à se reposer (*cf.* table 1).

Les affections cognitives de la maladie de Huntington épargnent souvent la mémoire à long-terme mais atteignent en revanche les fonctions d'exécution telles que l'organisation, la planification ou la faculté d'adaptation et retardent l'acquisition de nouvelles compétences motrices (Folstein, 1989; Snowden *et al.*, 2002). Ces caractéristiques s'accroissent au fil du temps ; la parole décline plus vite que les capacités de compréhension. Contrairement à la cognition, les symptômes psychiatriques et comportementaux ne semblent pas progresser au cours de la maladie. Cependant, la dépression est caractéristique et le suicide est 5 à 10 fois supérieur chez les malades que dans la population générale (Baliko *et al.*, 2004; Di Maio *et al.*, 1993; Robins Wahlin *et al.*, 2000; Snowden *et al.*, 2002). Certains patients développent également des symptômes maniaques et psychotiques (Snowden *et al.*, 2002).

Bien qu'utile pour le diagnostic, la chorée est un mauvais marqueur de la sévérité de la maladie (Mahant *et al.*, 2003; Young *et al.*, 1986). Les patients qui ont déclaré la maladie de Huntington de façon précoce ne développent pas de chorée, sinon de façon très transitoire. La plupart des malades sont atteints par une chorée qui est progressivement remplacée par la dystonie et une rigidité posturale (Mahant *et al.*, 2003; Young *et al.*, 1986).

Une autre caractéristique de la maladie de Huntington qui contribue à l'hyperactivité des patients est la non-persistance motrice, c'est-à-dire l'incapacité de maintenir la contraction volontaire d'un muscle à un niveau constant (Gordon *et al.*, 2000). Cette dernière est indépendante de la chorée et progresse linéairement, faisant d'elle un marqueur potentiel de l'évolution de la MH.

En raison de l'aggravation des déficits moteurs et cognitifs, les patients ne meurent pas de la MH elle-même, mais de complications liées aux chutes, à la dysphagie, à une défaillance cardiaque, ou encore à des problèmes respiratoires. La mort survient en moyenne une vingtaine d'années après le diagnostic de la maladie (Folstein, 1989).

Plus d'un siècle après la découverte de la maladie par George Huntington, il n'existe toujours pas de traitement efficace, et la MH conduit inexorablement à la mort.

Désordres comportementaux et symptômes des patients atteints de la maladie de Huntington

Apathie ou manque d'initiative
Dysphonie
Irritabilité
Agitation et anxiété
Perte de l'esprit critique

Symptômes fréquents (20 à 50 % des patients)

Désinhibition
Humeur dépressive
Euphorie
Aggressivité

Symptômes peu fréquents (5 à 12 %)

Délire
Obsession

Symptômes rares (< 5 %)

Hyperactivité sexuelle
hallucinations

Table 1.

IV.2 Caractéristiques neurochimiques et neuropathologiques

Les changements neuropathologiques dans la MH sont extrêmement sélectifs. Ils consistent en une perte cellulaire sévère et une atrophie qui atteint d'abord le noyau caudé et s'étend ensuite au putamen (Gutekunst, 2002; Rubinsztein, 2003; Vonsattel & DiFiglia, 1998). Les cerveaux de patients décédés à un stade avancé de la maladie présentent une dilatation des ventricules latéraux qui résulte de l'atrophie du striatum (*cf.* figure 17). Les neurones striataux épineux sont les plus vulnérables. Parmi eux, les neurones à enképhaline qui projettent sur le GPe sont plus touchés que les neurones à substance P qui innervent le GPi (Gutekunst, 2002; Rubinsztein, 2003). Les interneurones sont en général épargnés. Les autres régions cérébrales affectées par la MH comprennent la substance noire, les couches corticales III, V et VI, la région CA1 de l'hippocampe (Spargo *et al.*, 1993), le gyrus angulaire du lobe pariétal (Macdonald & Halliday, 2002; Macdonald *et al.*, 1997), les cellules du Purkinje du cervelet (Jeste *et al.*, 1984), les noyaux tubéro-latéraux de l'hypothalamus (Kremer, 1992; Kremer *et al.*, 1991) et le complexe centromédian-parafasciculaire du thalamus (Heinsen *et al.*, 1999).



Figure 17. Coupes coronales des cerveaux d'un individu normal et d'un individu atteint de la maladie de Huntington. Notez l'atrophie du noyau caudé et du putamen chez le malade (MH). Notez aussi l'atrophie du cortex à ce stade de la maladie.

Il est possible, lors des stades symptomatiques précoces de la MH, que le cerveau ne présente pas de neurodégénérescence (Gomez-Tortosa *et al.*, 2001; Mizuno *et al.*, 2000; Myers *et al.*, 1991). Quoiqu'il en soit, les signes d'un dysfonctionnement neuronal sont abondants, même chez les individus asymptomatiques. Les neurones corticaux présentent une diminution du marquage des fibres nerveuses, des neurofilaments, de la tubuline, et une

diminution de la concentration de la complexine 2 (DiProspero *et al.*, 2004; Modregger *et al.*, 2002). Ces éléments sont associés aux fonctions synaptiques, à l'intégrité du cytosquelette et au transport axonal, ce qui suggère un rôle important du dysfonctionnement cortical dans la physiopathologie de la maladie.

IV.3 Génétique

La maladie de Huntington se transmet sur le mode autosomique dominant, et a donc 50% de chance d'atteindre les descendants à chaque génération, quelque soit leur sexe. Le gène responsable de la MH a été identifié en 1993 par le *Huntington's Disease Collaborative Research Group*. Le gène HD est situé sur le bras court du chromosome 4 et contient une importante répétition polymorphe de triplets. Les allèles normaux contiennent des répétitions CAG, mais lorsque leur nombre est supérieur ou égal à 41, la pénétrance de la MH est totale (Gutekunst, 2002; McNeil *et al.*, 1997; Rubinsztein *et al.*, 1996). Une pénétrance incomplète est observée entre 36 et 40 répétitions, et en dessous de 36 répétitions, les sujets ne sont pas atteints. Le nombre de répétitions CAG rend compte à 60% de la variation dans l'âge de début de la maladie, les 40% restants étant dépendants de l'environnement et du terrain génétique (Chattopadhyay *et al.*, 2005; Chattopadhyay *et al.*, 2003; Djousse *et al.*, 2004; Kehoe *et al.*, 1999; Rosenblatt *et al.*, 2001; Wexler *et al.*, 2004).

Les répétitions de triplets CAG d'un nombre supérieur à 28 présentent une instabilité de réplication qui augmente avec la taille de la répétition. Cette instabilité conduit la plupart du temps à une expansion de triplets (73%) mais elle peut parfois aboutir à une contraction (23%) (Chattopadhyay *et al.*, 2005; Djousse *et al.*, 2004; MacDonald *et al.*, 1999). Cette instabilité est également plus importante au cours de la spermatogénèse que de l'ovogénèse, et les grandes expansions de triplets sont presque exclusivement observées chez les hommes (Kremer *et al.*, 1995; Ranen *et al.*, 1995; Trottier *et al.*, 1994). Ces observations expliquent *i)* le phénomène d'anticipation par lequel l'âge de déclaration de la MH devient de plus en plus précoce au fil des générations, *ii)* l'apparente hérédité paternelle de la maladie chez les enfants avec une apparition juvénile des symptômes. Selon le même raisonnement, les nouveaux cas de MH qui se déclarent sans antécédents familiaux, présentent une amplification de triplets à la frontière de la normalité (28 à 35 répétitions CAG), la plupart du temps du côté paternel.

Bien que minoritaire, il existe une mosaïque somatique des expansions dans le striatum des patients et des modèles animaux de la maladie (Anca *et al.*, 2004; Georgiou *et al.*, 1999; Squitieri *et al.*, 2003; Wexler *et al.*, 1987).

Les cas d'homozygotie de la maladie ne présentent pas de différence significative de l'âge de déclaration de la maladie (Wexler *et al.*, 1987), mais sa progression peut être accélérée (Squitieri *et al.*, 2002; Squitieri *et al.*, 2003).

IV.4 Épidémiologie

La maladie de Huntington montre une prévalence stable dans la population blanche d'environ 5 à 7 individus affectés sur 100 000. Des exceptions existent dans des zones géographiques où l'origine de la population peut être retracée jusqu'à quelques fondateurs, comme la Tasmanie (Pridmore, 1990) et autour du lac Maracaibo au Venezuela (Young *et al.*, 1986). Au Japon, la prévalence de la maladie n'est que de 0,5 sur 100 000, et la fréquence est encore plus faible dans le reste de l'Asie (Takano *et al.*, 1998). Les populations africaines montrent elles aussi une prévalence réduite, bien que certaines zones où ont lieu des mariages mixtes avec la population blanche présentent une fréquence plus élevée (Folstein, 1989; Harper, 2002; Hayden, 1981).

La raison de la persistance des différences d'incidence de la maladie demeure inconnue. Aucune étude n'a montré une diminution ou une augmentation du nombre d'enfants des personnes malades. De plus, le gène de la huntingtine ne semble conférer aucun avantage en dehors d'une éventuelle baisse de l'incidence du cancer (Sorensen *et al.*, 1999), qui est peut être liée à la régulation positive du gène suppresseur TP53 dans la MH.

IV.5 Huntingtine et physiopathologie

La huntingtine est exprimée dans toutes les cellules de mammifère, avec les plus grandes concentrations dans le cerveau et les testicules ; des niveaux modérés sont observés dans le foie, le cœur et les poumons (DiFiglia *et al.*, 1995). Il existe des orthologues de la protéine dans plusieurs espèces dont le poisson-zèbre (*Danio rerio*) et la drosophile (Jones, 2002). La fonction de la protéine sauvage est encore très peu connue, de même que le processus pathologique mis en jeu dans la MH.

La MH étant une affection autosomique dominante, elle pourrait se développer en raison d'une haplo-insuffisance, c'est à dire d'un niveau trop faible de production d'une

protéine nécessaire aux fonctions vitales de la cellule. Cependant, les cas de délétion terminale ou de disruption du gène HD chez l'homme ne développent pas la MH (Ambrose *et al.*, 1994).

Une caractéristique pathologique de la MH est l'apparition d'inclusions nucléaires et cytoplasmiques qui contiennent de la huntingtine mutante (Davies *et al.*, 1997). Bien qu'indicatives du processus pathologique et présentes chez les malades bien avant l'apparition des premiers symptômes (Gomez-Tortosa *et al.*, 2001), il est de plus en plus évident que ces inclusions ne sont pas les marques d'un dysfonctionnement cellulaire ou de l'évolution de la maladie, qui semblent plutôt liés à des stades intermédiaires d'agrégats de polyglutamine (Mukai *et al.*, 2005). Dans certaines souris transgéniques modèles de la maladie, les inclusions ne sont observées qu'après l'apparition des premiers symptômes. Les cellules possédant des inclusions semblent survivre plus longtemps que les autres (Menalled *et al.*, 2003) et il existe une faible corrélation entre l'apparition des inclusions et le début du dysfonctionnement ou des symptômes neurologiques, aussi bien dans les modèles que dans la maladie elle-même (Arrasate *et al.*, 2004; Gomez-Tortosa *et al.*, 2001; Menalled *et al.*, 2003; Zuccato *et al.*, 2005). Un composé qui stimulerait la formation des agrégats pourrait donc diminuer les phénomènes neuropathologiques (Bodner *et al.*, 2006).

Certaines études suggèrent que la copie mutante du gène HD confère un gain de fonction toxique. Cette hypothèse est supportée par l'existence de neuf autres pathologies humaines associées à des expansions de polyglutamine : les ataxies spino-cérébelleuses 1, 2, 3, 6, 7, 12 et 17 ; l'atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne ; et l'atrophie musculaire spinale et bulbaire (Andrew *et al.*, 1993b; Benn, 2002; Geschwind *et al.*, 1997a; Geschwind *et al.*, 1997b; Komure *et al.*, 1995; Margolis & Ross, 2001; Mariotti *et al.*, 2000; O'Hearn *et al.*, 2001; Piccioni *et al.*, 2001; Pulst, 2003; Stevanin *et al.*, 2000). Aucun rôle important de l'haplo-insuffisance n'est rapporté pour ces maladies. Les neuf pathologies présentent toutes des inclusions neuronales contenant des agrégats de polyglutamine et une neurodégénérescence sélective.

Le mécanisme par lequel l'agrégation des glutamines conduit à une dysfonction neuronale spécifique dans la MH et éventuellement à la neurodégénérescence, n'a pas encore été élucidé, mais plusieurs processus clés ont été identifiés (*cf.* figure 18). Les premières étapes impliqueraient la protéolyse et l'agrégation. En effet, la huntingtine mutante est plus susceptible à la protéolyse que la protéine sauvage, et sa troncation semble faciliter l'agrégation (Jones, 2002; Lunkes & Mandel, 1998; Peters *et al.*, 1999b; Saudou *et al.*, 1998; Wellington *et al.*, 2000). Par ailleurs, les agrégats de protéine tronquée seraient toxiques et

capables de translocation dans le noyau (Lunkes & Mandel, 1998; Mukai *et al.*, 2005; Saudou *et al.*, 1998).

La production prolongée de huntingtine mutante et la formation d'agrégats empêcheraient l'autodestruction des cellules par leurs protéasomes ou vacuolisation autophagique (Benn, 2002; Rangone *et al.*, 2004; Rubinsztein, 2003). Par ailleurs, les agrégats interfèreraient avec d'autres protéines en les recrutant dans leur matrice. Ces protéines étant en partie celles qui interagissent normalement avec la huntingtine sauvage (Benn, 2002; Mills *et al.*, 2005; Rangone *et al.*, 2004; Rubinsztein, 2003), il est possible que la huntingtine mutante, tronquée et agrégée, conserve des sites de fixation actifs. Par ces mécanismes, et probablement par d'autres, la huntingtine mutante affecte de nombreuses protéines nucléaires et cytoplasmiques qui régulent la transcription (Benn, 2002; Cha, 2007; Rubinsztein, 2003), l'apoptose (Benn, 2002; Hickey & Chesselet, 2003; Rubinsztein, 2003), les fonctions mitochondriales (Benn, 2002; Panov *et al.*, 2003; Rubinsztein, 2003), la suppression de tumeur (Bae *et al.*, 2005), la libération de neurotransmetteur (DiProspero *et al.*, 2004; Modregger *et al.*, 2002; Squitieri *et al.*, 2002) et le transport axonal (Charrin *et al.*, 2005). La huntingtine mutante n'apporterait donc pas uniquement un gain de fonction toxique mais exercerait aussi un effet dominant négatif dans lequel elle interfère avec les fonctions de la huntingtine sauvage (Busch *et al.*, 2003; Gauthier *et al.*, 2004; Zuccato *et al.*, 2005).

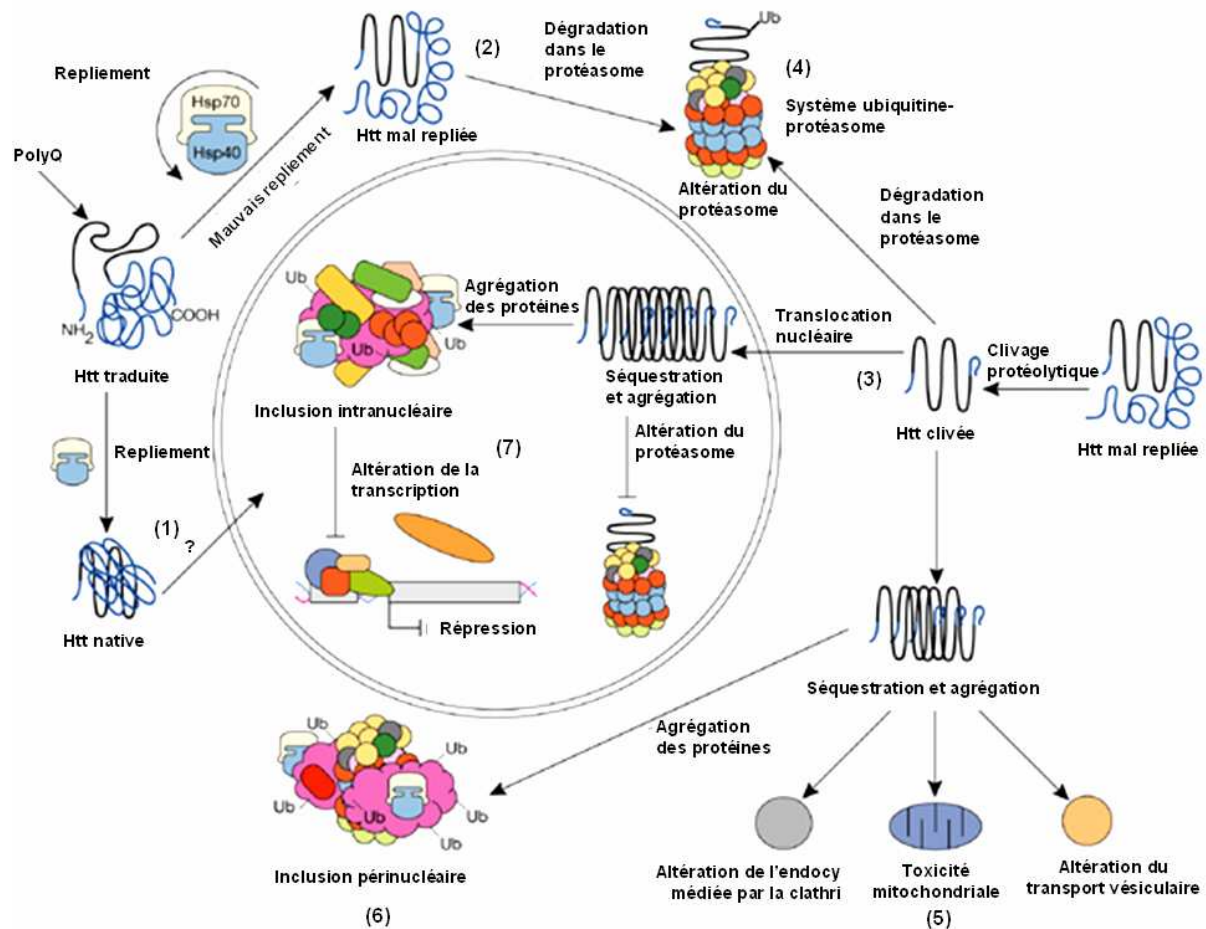


Figure 18. Modélisation de l'agrégation de la huntingtine mutée et de ses effets dans un neurone. (1) les protéines chaperonnes (Hsp70 et Hsp40) amorcent le repliement de la huntingtine (htt) normale néosynthétisée. La htt peut alors assurer ses fonctions dans le cytoplasme et le noyau du neurone. (2) Lorsque les chaperonnes détectent une conformation incorrecte de la huntingtine, elles tentent de la corriger. En cas d'insuccès, la huntingtine mal conformée est ubiquitinée et adressée au protéasome. (3) L'expansion de glutamine dans la huntingtine mutée modifie sa conformation. Elle est clivée par des caspases et calpaïnes, et les fragments N-terminaux porteurs du motif polyQ, s'ils ne sont pas dégradés par le protéasome ou par autophagie (4), s'accumulent dans le cytoplasme et le noyau. Ils forment alors des agrégats cytoplasmiques aux cibles multiples (5) et des inclusions périnucléaires (6) et intranucléaires (7) en séquestrant d'autres protéines, telles que la huntingtine normale ou des protéines intervenant dans la régulation de la transcription, les empêchant d'assurer leurs fonctions.

D'après (Landles & Bates, 2004).

IV.6 Modèles

IV.6.1 Modèles R6

Les premiers modèles animaux de la MH furent développés dans les années 1970 sur la base de la vulnérabilité spécifique des neurones striataux aux acides aminés excitotoxiques (Sanberg & Coyle, 1984). Ces neurones possèdent de nombreux récepteurs au glutamate puisqu'il s'agit du neurotransmetteur de la voie cortico-striée. Les neurones striataux sont également sensibles à l'acide 3-nitropropionique, une toxine mitochondriale, ce qui suggère que la maladie de Huntington affecterait le métabolisme énergétique neuronal (Brouillet *et al.*, 2005).

Les premiers modèles animaux transgéniques de la MH furent développés chez la souris (Mangiarini *et al.*, 1996), puis chez la drosophile et le nématode (Das & Vaddadi, 2004; Vaddadi, 1996).

Les modèles R6/1 et R6/2 sont les premiers modèles de souris transgéniques de la maladie de Huntington. Ils expriment tout deux un fragment de l'exon 1 du gène HD humain et contiennent respectivement environ 115 à 150 répétitions CAG (Mangiarini *et al.*, 1996). L'expression du transgène est sous le contrôle du promoteur humain de la huntingtine. Les niveaux d'expression du transgène sont 31% et 75% de celui de la huntingtine endogène dans les R6/1 et R6/2. Consécutivement à la génération des modèles R6, plusieurs autres modèles murins de la MH ont été développés (Menalled & Chesselet, 2002). Ils varient selon plusieurs paramètres, faisant de chacun un modèle unique, ce qui rend difficile la comparaison d'études conduites sur différents modèles. Une source de variabilité cruciale est le nombre de répétitions CAG exprimées. La taille du fragment génique est également une différence importante et, la plupart du temps seul un fragment de la huntingtine est exprimé. Les souris R6 expriment seulement l'exon 1 (sur les 67 exons que compte le gène), codant environ 3% de la région N-terminale de la protéine qui contient le stretch de polyglutamine (Mangiarini *et al.*, 1996). En revanche, d'autres modèles expriment de plus grandes portions de la huntingtine, parfois même la protéine entière (Hodgson *et al.*, 1999). Le promoteur qui dirige l'expression du transgène est également un important facteur influençant le niveau d'expression de la protéine mutante et donc le développement de la pathologie. Certains modèles murins correspondent à des souris *knock-in* (Menalled & Chesselet, 2002), c'est-à-dire que les répétitions CAG sont exprimées dans l'homologue murin de la huntingtine dont

l'expression est contrôlée par le promoteur endogène. Enfin, le fond génétique de la souche utilisée pour générer les souris transgéniques est naturellement très important car il peut influencer l'expression du gène HD (Menalled & Chesselet, 2002). Parmi tous les modèles de la MH, le modèle murin R6/2 est celui qui développe les symptômes le plus rapidement et possède le plus grand nombre d'inclusions de huntingtine dans le cerveau.

IV.6.1.1 Changements comportementaux des souris R6

Les souris R6/1 et R6/2 présentent une série de changements comportementaux qui se développent graduellement. Les premiers symptômes moteurs apparaissent vers l'âge de trois semaines. Les souris sont hyperactives à ce stade (Luesse *et al.*, 2001) et présentent très vite les premiers signes d'altération de l'apprentissage et de la mémoire dans le test du labyrinthe aquatique de Morris, qu'il n'est plus possible d'effectuer à 7 semaines en raison de la sévérité des déficiences motrices (Luesse *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2000). Les souris R6/2, initialement hyperactives, réduisent progressivement leur activité motrice pour atteindre un état hypoactif vers 8 semaines (Carter *et al.*, 1999; Luesse *et al.*, 2001). Au même moment, les souris présentent une anomalie du repliement des pattes ; lorsqu'elles sont suspendues par la queue, les souris normales écartent leurs pattes, alors que les R6/2 maintiennent leurs membres serrés contre leur thorax et leur abdomen. La physiopathologie de cette réponse n'est pas complètement comprise, mais le test de repliement des pattes est classiquement utilisé pour étudier de nouveaux traitements en raison de la simplicité de sa réalisation. Aux alentours du même âge, les souris R6/2 commencent à présenter d'autres changements comportementaux, comme la toilette stéréotypée des membres postérieurs, une altération de la marche et l'apparition de mouvements involontaires. Finalement, les souris R6/2 sont sérieusement affectées à l'âge de 8 à 12 semaines (Carter *et al.*, 1999; Luesse *et al.*, 2001), et meurent autour de la 13^{ème} semaine (Mangiarini *et al.*, 1996). Chez la souris R6/1, dont l'espérance de vie est considérablement plus longue (32 à 40 semaines), il faut attendre 13 à 20 semaines pour observer un phénotype équivalent à celui des R6/2 (Hansson *et al.*, 2001).

IV.6.1.2 Pathologie cérébrale dans les souris R6

Bien que les mécanismes sous-jacents aux caractéristiques comportementales des souris R6 demeurent relativement incompris, les changements pathologiques graduels de leurs cerveaux sont bien décrits.

La souris R6/2 de 12 semaines possède un cerveau dont le poids est de 20% inférieur à celui d'une souris normale (Davies *et al.*, 1997). Cependant, il n'a jamais été observé de mort

cellulaire substantielle qui pourrait expliquer cette différence de volume. Dans le cortex et le striatum, une très faible proportion de neurones meurent selon un mode qui ne correspond ni à l'apoptose, ni à la nécrose (Iannicola *et al.*, 2000; Turmaine *et al.*, 2000). Récemment, une perte progressive de neurones a été observée dans l'hypothalamus (Petersen *et al.*, 2005). La petite taille du cerveau des R6/2 résulte probablement de l'atrophie de neurones individuels et d'une diminution massive du neuropile. Dans le striatum des R6/2, les corps cellulaires des neurones épineux auraient une taille amoindrie de 20%, et leurs champs dendritiques seraient également réduits.

Les souris R6/2 présentent des inclusions neuronales dans leur striatum et leur cortex dès l'âge de 3-4 semaines. La proportion de cellules contenant des inclusions varie considérablement d'une structure à l'autre et est dépendante de l'âge des individus, de telle sorte qu'au stade terminal et dans certaines régions, tous les neurones possèdent des inclusions (Meade *et al.*, 2002).

Chaque modèle est unique et ne reproduit que partiellement le phénotype de la MH telle qu'elle se développe chez l'homme. Bien sûr, des différences de symptômes majeures sont attendues entre les souris transgéniques et les patients atteints de la MH. De plus, les caractéristiques morphologiques observées chez la souris et chez l'homme, comme la formation d'agrégats ou la mort cellulaire sont au mieux analogues.

IV.6.2 Modèles cellulaires – Modèle lentiviral

Des modèles *in vitro* de la MH ont été développés à partir de nombreuses lignées cellulaires, dont des cultures cellulaires transfectées (Goffredo *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 1999; Saudou *et al.*, 1998), des neurones primaires de souris transgéniques, et des lignées de cellules striatales dérivées de souris *knock-in* (Petersen *et al.*, 2001; Snider *et al.*, 2003; Trettel *et al.*, 2000; Zeron *et al.*, 2004). Ces modèles ont été utilisés pour identifier des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la MH, mais le dysfonctionnement neuronal induit par la huntingtine (htt) mutante et la séquence des événements entraînant la mort de la cellule demeurent incompris.

Récemment, un nouveau modèle qui tente de récapituler la séquence des événements provoquant la dégénérescence des cellules a été décrit (Zala *et al.*, 2005). Il est basé sur l'infection de neurones striataux de rats E16 avec un vecteur lentiviral codant les 171 premiers acides aminés de la htt mutante (82 Q). Dans ce dispositif, la pathologie associée à la surexpression de la htt mutante est caractérisée par trois phases distinctes : *i*) une

accumulation progressive de la htt mutante pendant les trois premières semaines suivant l'infection mais sans signe de neuropathologie des cellules ; *ii*) des inclusions de htt et un dysfonctionnement neuronal vers 4 à 6 semaines ; *iii*) une mort des cellules entre 6 et 8 semaines post-infection. En comparaison avec les autres modèles *in vitro*, celui de Zala et collaborateurs décrit une progression lente de la pathologie, ce qui permet potentiellement de décomposer la cascade des événements à l'origine de la mort des cellules striatales. Par ailleurs, la toxicité de la huntingtine mutante observée dans ce modèle *in vitro* concorde avec celle observée *in vivo* chez le rat adulte infecté avec le même dispositif lentiviral (de Almeida *et al.*, 2002).

Le niveau d'expression de la huntingtine mutante semble crucial dans la génération de modèles de la MH. En effet, certaines études sur des souris transgéniques n'ont montré aucune différence entre les taux de survie de cultures de neurones striataux issus de souris mutantes (R6/2 et YAC72) et celles de neurones striataux issus de souris sauvages (Petersen *et al.*, 2001; Zeron *et al.*, 2004). Au contraire, des neurones primaires transfectés avec un plasmide exprimant la htt mutée dégénèrent en seulement quelques jours en raison de la haute expression du transgène (Saudou *et al.*, 1998). La chronicité de la pathologie observée dans le modèle des cellules infectées avec la htt171-82Q est probablement liée à l'intégration du vecteur lentiviral dans des sites chromosomiques transcriptionnellement actifs (Schroder *et al.*, 2002). De plus, la mort cellulaire induite par la htt mutante dans ce modèle semble spécifique, dans la mesure où les neurones corticaux sont épargnés jusqu'à 8 semaines après leur infection et ce en dépit de la présence d'inclusions dans ces cellules.

V LA MALADIE DE PARKINSON

V.1 Caractéristiques cliniques

La maladie de Parkinson (MP) doit son nom à Sir James Parkinson, médecin londonien qui l'a décrite le premier, en 1817. La MP est une maladie progressive qui se déclare vers 55 ans et dont l'incidence augmente avec l'âge de 0.2% en moyenne à 1.2% à 70 ans. Dans environ 90% des cas, il n'y a pas de liaison génétique évidente (d'où le terme de MP sporadique) mais dans les 10% restants, la maladie est héréditaire. Les symptômes s'aggravent au fil du temps et, avant l'introduction du traitement à la levodopa, la mortalité des patients était trois fois supérieure à celle des individus du même âge. Malgré l'amélioration des conditions de vie des malades grâce à la levodopa et à la stimulation haute fréquence du noyau subthalamique, des études de survie montrent que ces patients continuent à présenter une espérance de vie réduite par rapport à la population générale (Hely *et al.*, 1989; Morgante *et al.*, 2000). De plus, la plupart des patients souffrent de désordres moteurs après 5 à 10 ans de maladie, même lorsqu'ils reçoivent un traitement.

D'un point de vue clinique, toute maladie qui se manifeste par un défaut de dopamine striatale ou une détérioration directe du striatum, conduit au parkinsonisme. Ce syndrome se caractérise par les tremblements au repos, la rigidité, la lenteur ou l'absence des mouvements volontaires, une instabilité posturale et des périodes de blocage moteur. La MP est la cause la plus fréquente de parkinsonisme puisqu'elle représente 80% des cas.

Les tremblements ont lieu au repos mais diminuent avec l'exécution du mouvement volontaire et ne gênent donc pas les activités de la vie quotidienne. La rigidité fait référence à la résistance accrue à un mouvement passif des membres du malade. La bradykinésie (lenteur du mouvement), l'hypokinésie (réduction de l'amplitude des mouvements) et l'akinésie (absence de mouvements inconscients normaux comme le balancement des bras lors de la marche) se manifestent par de nombreux symptômes, dont l'hypomimie (absence d'expression du visage), l'hypophonie (diminution du volume de la voix), la micrographie (écriture de petite taille), des troubles de la déglutition et la réduction de la taille des foulées lors de la marche. La bradykinésie peut être un réel handicap puisqu'elle ralentit significativement la vitesse d'exécution des gestes de la vie de tous les jours, comme se vêtir ou se nourrir. Les patients parkinsoniens adoptent une posture courbée caractéristique, et la perte de leurs réflexes posturaux peut aller jusqu'à leur confinement en chaise roulante. Le

blocage moteur, c'est-à-dire l'incapacité des patients à initier un mouvement volontaire comme la marche est un symptôme classique de la MP. Des altérations de l'humeur et de la cognition sont courantes : les malades deviennent passifs ou démissionnaires, et manquent d'initiative. Les réactions sont décalées et les processus cognitifs lents. La dépression est fréquente, ainsi que la démence, surtout chez les patients âgés. Les différents symptômes sont récapitulés dans la table 2.

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif de la MP. En effet, si des traitements existent, qu'ils soient pharmacologiques (administration de levodopa) ou neurochirurgicaux (stimulation cérébrale profonde), ils sont incapables d'enrayer le processus neurodégénératif.

Désordres comportementaux et symptômes des patients atteints de la maladie de Parkinson	
Symptômes moteurs	
Modifications posturales	Attitude générale fléchie
Troubles de la marche	Lenteur au démarrage, petits pas
Troubles des mouvements automatiques	Absence de balancement des bras à la marche, troubles de la déglutition
Troubles de la parole	Lenteur, monotonie, hypophonie
Troubles de l'écriture	Micrographie
Troubles respiratoires	Rigidité et akinésie respiratoires
Autres symptômes	
Troubles neuropsychiatriques	Troubles cognitifs, confusion mentale, psychose, dépression
Troubles digestifs	Dysphagie, constipation
Troubles urinaires	Urgences mictionnelles, pollakiurie nocturne
Troubles sexuels	Modifications de la libido
Troubles sécrétoires	Séborrhée, sudations exagérées

Table 2.

V.2 Caractéristiques neurochimiques et neuropathologiques

Les deux signatures pathologiques de la MP sont la présence d'inclusions cytoplasmiques intraneuronales, les « corps de Lewy » (*cf.* figure 19) et la perte de neurones dopaminergiques de la voie nigrostriatale (Agid, 1991). La perte de ces neurones, qui contiennent chez l'homme une quantité considérable de neuromélanine (Marsden, 1983), conduit à une dépigmentation caractéristique de la substance noire compacte (*cf.* figure 19).

Le nombre de neurones dopaminergiques nigraux est proche de 450 000 à la naissance (McGeer *et al.*, 1988), et décroît d'environ 5% tous les 10 ans chez les sujets sains. A 60 ans, le nombre de neurones dopaminergiques avoisine les 250 000, alors qu'il n'excède pas 140 000 chez le patient parkinsonien (McGeer *et al.*, 1988). Cette importante diminution du nombre de neurones dopaminergique est responsable d'une forte chute des taux de dopamine striatale, d'une diminution de l'activité de la tyrosine hydroxylase et d'une perte des transporteurs de dopamine (Uhl *et al.*, 1994). Les symptômes moteurs de la maladie semblent directement liés à la dénervation striatale (Lee *et al.*, 2000b).

Des lésions secondaires non nigrales sont également observées dans la MP (Agid, 1991). En effet, d'importantes pertes neuronales ont été constatées dans l'ATV, le locus coeruleus, le raphé et le noyau basal de Meynert. Ces lésions s'expriment par des troubles psychiques, un déclin cognitif ou des démences, alors que les symptômes moteurs essentiels sont liés à l'altération de la voie nigrostriatale.

La dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN semble provoquer des phénomènes de compensation pré- et post-synaptiques (Agid, 1991). Une augmentation de l'activité neuronale ainsi qu'une sensibilisation des récepteurs dopaminergiques striataux D2 sont en effet observées lors de la phase latente de la maladie. Ce phénomène permet d'expliquer que l'apparition des premiers symptômes n'ait lieu qu'après une perte neuronale d'environ 60%. Cette observation est d'une grande importance puisqu'elle signifie que les premiers symptômes moteurs de la maladie ne deviennent décelables que lorsque le processus dégénératif est déjà très avancé.

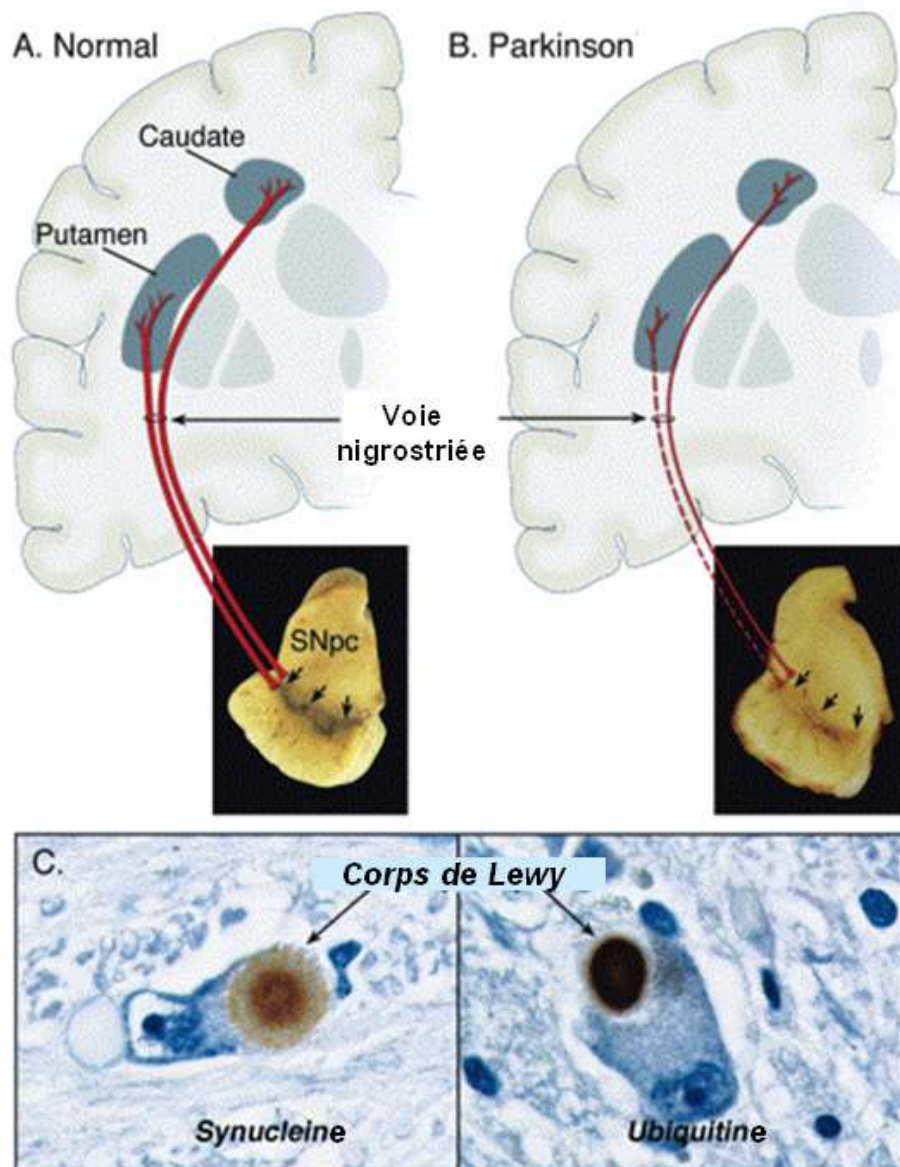


Figure 19. Neuropathologie de la maladie de Parkinson. En comparaison aux individus sains (A), les patients atteints par la MP présentent une dépigmentation de la substance noire compacte (SNpc), caractéristique de la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriatale (B). Chez les malades, les neurones dopaminergiques de la SNpc contiennent des inclusions intracytoplasmiques qui peuvent être révélées par l'immunocytochimie de l' α -synucléine et de l'ubiquitine (C).

D'après (Dauer & Przedborski, 2003).

V.3 Étiologie

L'origine de la MP sporadique est inconnue, et le rôle de toxines environnementales ou de facteurs génétiques demeure confus. L'hypothèse d'une toxine environnementale a été privilégiée pendant la plus grande partie du 20^{ème} siècle, essentiellement en raison de l'existence de la MP post-encéphalitique et du parkinsonisme provoqué chez de jeunes toxicomanes par le 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), toxine produite par inadvertance lors de fabrication artisanale de drogue. Cependant, la découverte de gènes de la MP a ravivé l'intérêt porté aux facteurs de susceptibilité héréditaires. Les deux phénomènes jouent probablement un rôle.

L'hypothèse environnementale repose sur le principe d'une neurodégénérescence induite par l'exposition à une neurotoxine dopaminergique. Théoriquement, la neurodégénérescence progressive de la MP pourrait être provoquée par une exposition chronique à la neurotoxine ou par une brève exposition qui initierait une cascade d'évènements néfastes. L'intoxication au MPTP est un exemple typique de la façon dont une toxine exogène peut être à l'origine des caractéristiques pathologiques et cliniques de la MP (Langston *et al.*, 1983).

Des études épidémiologiques dans les populations humaines ont mis en relation la résidence en milieu rural et l'exposition relative aux herbicides et pesticides, avec un risque élevé de MP (Tanner, 1992). Notamment, le paraquat, qui est un composé structuralement similaire au 1-méthyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), le métabolite actif du MPTP (*cf.* figure 20), a été utilisé comme herbicide. Par ailleurs, comme le MPP⁺, la roténone est un poison mitochondrial présent dans l'environnement et a été utilisée comme insecticide. Cependant, aucune donnée ne permet d'identifier une toxine spécifique qui serait à l'origine de la MP sporadique.

Par ailleurs, le fait que la fumée de cigarette et la consommation de café soient inversement associées au risque de développer la MP (Hernan *et al.*, 2002) renforce l'hypothèse que des facteurs environnementaux jouent un rôle dans la susceptibilité à la maladie.

Une autre hypothèse met en cause l'existence de toxines endogènes qui seraient responsables de la neurodégénérescence. Une source endogène de toxicité pourrait être le métabolisme de la dopamine qui génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS- *reactive oxygen species*) (Cohen, 1984).

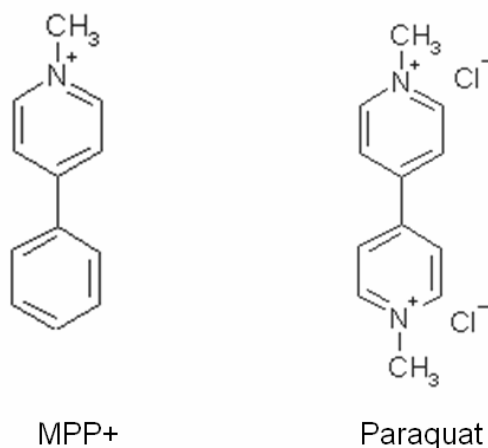


Figure 20. Structure moléculaire du MPP+ et du paraquat. Le MPP+ est le métabolite actif du MPTP. Notez la similarité de sa structure avec celle du paraquat.

V.4 Génétique

Au cours de ces dix dernières années, les études menées sur des jumeaux ont permis la découverte de formes familiales de MP (Golbe *et al.*, 1990; Golbe *et al.*, 1996). Il est aujourd'hui reconnu qu'environ 10% des cas de MP sont héréditaires et monogéniques (Mouradian, 2002) (*cf.* table 3).

L' α -synucléine fut le premier gène à être identifié, car il était à l'origine du parkinsonisme autosomique-dominant d'une famille italo-américaine. En effet, une mutation ponctuelle de l' α -synucléine, fut mise en évidence chez les malades de cette famille (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Deux autres mutations furent découvertes sur le même gène dans des familles grecques (Papadimitriou *et al.*, 1999) et allemandes (Kruger *et al.*, 1998). Ces observations furent d'une grande importance en raison du rôle soupçonné de l'agrégation de l' α -synucléine dans la physiopathologie de la MP. La découverte de la triPLICATION d'une région génomique de 2Mb contenant le gène de l' α -synucléine au sein d'une famille présentant une MP héréditaire (Singleton *et al.*, 2003) a confirmé son implication dans les formes autosomiques dominantes de la maladie. Toutefois, les mutations ponctuelles du gène de l' α -synucléine ne semblant être qu'une rare cause de MP (Gasser *et al.*, 1998), les recherches furent orientées vers d'autres gènes susceptibles d'être impliqués dans les formes autosomiques dominantes de la maladie. Ainsi, le nouveau locus PARK5 fut mis en évidence (Leroy *et al.*, 1998). Le gène PARK5 code l'ubiquitine carboxy-terminal hydrolase-L1 (UCHL1) dont la fonction est de dégrader les polymères d'ubiquitine en monomères, afin que

ces derniers puissent être recyclés. La mutation de PARK5 provoque une diminution de l'activité enzymatique d'UCHL1, conduisant à une altération de l'activité de dégradation des protéines par le complexe ubiquitine-protéasome (Mouradian, 2002). Comme l' α -synucléine, UCHL1 est retrouvée dans les corps de Lewy (Leroy *et al.*, 1998 ; Mouradian, 2002). Enfin, plusieurs mutations ont été mises en évidence dans le gène LRRK2 (Berg *et al.*, 2005) dont le produit serait impliqué dans certaines voies de signalisation intracellulaire. Les mutations du gène LRRK2 (PARK8) se transmettent selon un mode autosomique dominant (Lesage *et al.*, 2006) et conduisent à un phénotype parkinsonien très proche de celui observé dans les cas idiopathiques de la maladie, avec une apparition tardive et asymétrique des symptômes moteurs et une réponse à la levodopa (Khan *et al.*, 2005).

Les formes monogéniques du parkinsonisme récessif provoquées par les mutations des gènes Parkine (PARK2), PINK1 (PARK6) et DJ1 (PARK7) représentent une cause importante de MP précoce (début avant l'âge de 40 ans). Le parkinsonisme juvénile fut observé pour la première fois chez des patients japonais qui développaient une forme très précoce de la MP (dans les deux ou trois premières dizaines d'années de vie), liée à une région du chromosome 6 (Matsumine *et al.*, 1998). Des mutations furent rapidement identifiées dans le gène de la parkine situé dans cette région chromosomique (Kitada *et al.*, 1998). Notamment, l' α -synucléine, l'ubiquitine carboxy-terminal hydrolase-L1 et la parkine sont toutes trois en relation avec le système ubiquitine-protéasome et présentes dans les corps de Lewy. Une altération des mécanismes de dégradation, d'élimination et de recyclage des protéines serait donc probablement impliquée dans la physiopathologie de la MP. Plus récemment, des mutations responsables d'une forme autosomique récessive de la MP ont été mises en évidence dans le gène PINK1 (PTEN-induced kinase 1) (Shimura *et al.*, 2001). PINK1 serait une protéine mitochondriale dont le rôle de protecteur potentiel de la cellule contre le stress oxydant serait abrogé par les mutations (Valente *et al.*, 2004). Un autre locus récessif fut identifié sur le chromosome 1 d'une famille italienne consanguine (van Duijn *et al.*, 2001). Les mutations furent localisées dans le gène DJ1 (Bonifati *et al.*, 2002) dont le rôle demeure largement méconnu mais qui pourrait intervenir dans la réponse cellulaire au stress oxydant (Taira *et al.*, 2004).

Locus	Gène	Transmission	Age de début (ans)	Présence de corps de Lewy	Position
PARK1	α -synucléine	Dominante	40-50	Oui	4q21
PARK2	Parkine	Récessive	20-30	Non	6q25
PARK3	?	Dominante	60-70	Oui	2p13
PARK4	α -synucléine (triplication)	Dominante	30-40	Oui	4q21
PARK5	Ubiquitine C-terminal hydrolase L1	Dominante	~50	?	4p14
PARK6	PINK1	Récessive	~40	?	1p36-p35
PARK7	DJ1	Récessive	~40	?	1p38
PARK8	LRRK2	Dominante	~50	Oui	12p11.2-q13.1
PARK10	?	?	50-60	?	1p32
PARK11	?	?	Late onset	?	2q36

Table 3. Principales caractéristiques des formes génétiques de la maladie de Parkinson.

V.5 Physiopathologie

L'étude de modèles toxiques de la MP et de la fonction des gènes impliqués dans les formes héréditaires aboutit à la formulation de deux hypothèses sur la physiopathologie de la maladie. La première est que le mauvais repliement et l'agrégation des protéines jouent un rôle dans la mort des neurones dopaminergiques de la SNc, alors que la deuxième hypothèse met en cause un dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydatif qui en découle (*cf.* figure 21).

Les facteurs pathogènes évoqués ci-dessus ne sont pas mutuellement exclusifs. Un des enjeux de la recherche actuelle sur la MP est d'établir l'ordre dans lequel ces facteurs interviennent et découvrir d'éventuelles interactions entre ces différentes voies. Le fait qu'une détérioration oxydative de l' α -synucléine augmente ses capacités à s'agréger est un exemple d'une telle interaction (Giasson *et al.*, 2000). Une autre question importante pour la compréhension de la MP est de savoir si les nombreuses voies de signalisation cellulaires mises en jeu lors de la neurodégénérescence convergent toutes vers le même processus final, comme l'apoptose, ou si elles demeurent au contraire très divergentes.

V.5.1 Repliement et agrégation des protéines

Le dépôt anormal de protéines dans le tissu cérébral est une caractéristique de nombreuses maladies neurodégénératives dont la MP. Bien que la composition et la localisation (intra- ou extracellulaire) des agrégats protéiques diffèrent d'une maladie à l'autre, cette caractéristique commune suggère que l'agrégation protéique en soit, ou un évènement relié, pourrait être toxique pour les neurones.

Les protéines mal repliées, agrégées ou solubles peuvent être neurotoxiques selon différents mécanismes. Les agrégats de protéines peuvent être directement délétères, par exemple en déformant la cellule ou en interférant avec le trafic intracellulaire. Les inclusions de protéine peuvent également séquestrer d'autres protéines importantes pour la survie de la cellule. Dans ce cas, on attend une corrélation directe entre la formation des inclusions et la neurodégénérescence. Cependant, il est de plus en plus clair qu'il n'existe pas de telle corrélation, notamment d'après les données existant pour d'autres maladies comme la maladie de Huntington (MH) et les autres maladies à polyglutamine (Saudou *et al.*, 1998). Les inclusions cytoplasmiques ne seraient pas le simple résultat de la précipitation de protéines mal conformées, mais plutôt un processus actif ayant pour but de séquestrer les protéines mal conformées solubles (Kopito, 2000). La formation d'inclusions pourrait donc être une mesure défensive visant à éliminer les protéines mal conformées toxiques (Auluck *et al.*, 2002; Cummings *et al.*, 2001).

Chez les patients qui ont une MP héréditaire, les mutations sont connues pour être la cause directe de la maladie en induisant des formations protéiques anormales et parfois toxiques (Bussell & Eliezer, 2001) ou en interférant avec des processus qui reconnaissent normalement les protéines mal conformées. Dans la MP sporadique, les origines du dysfonctionnement du métabolisme des protéines commencent tout juste à être élucidées. L'une d'entre elles pourrait être le stress oxydant, connu pour jouer un rôle dans la MP *via* la toxicité des ROS. Dans la MP, les corps de Lewy contiennent de l' α -synucléine oxydée qui possède *in vitro* de plus grandes facultés d'agrégation que l' α -synucléine non modifiée (Giasson *et al.*, 2000).

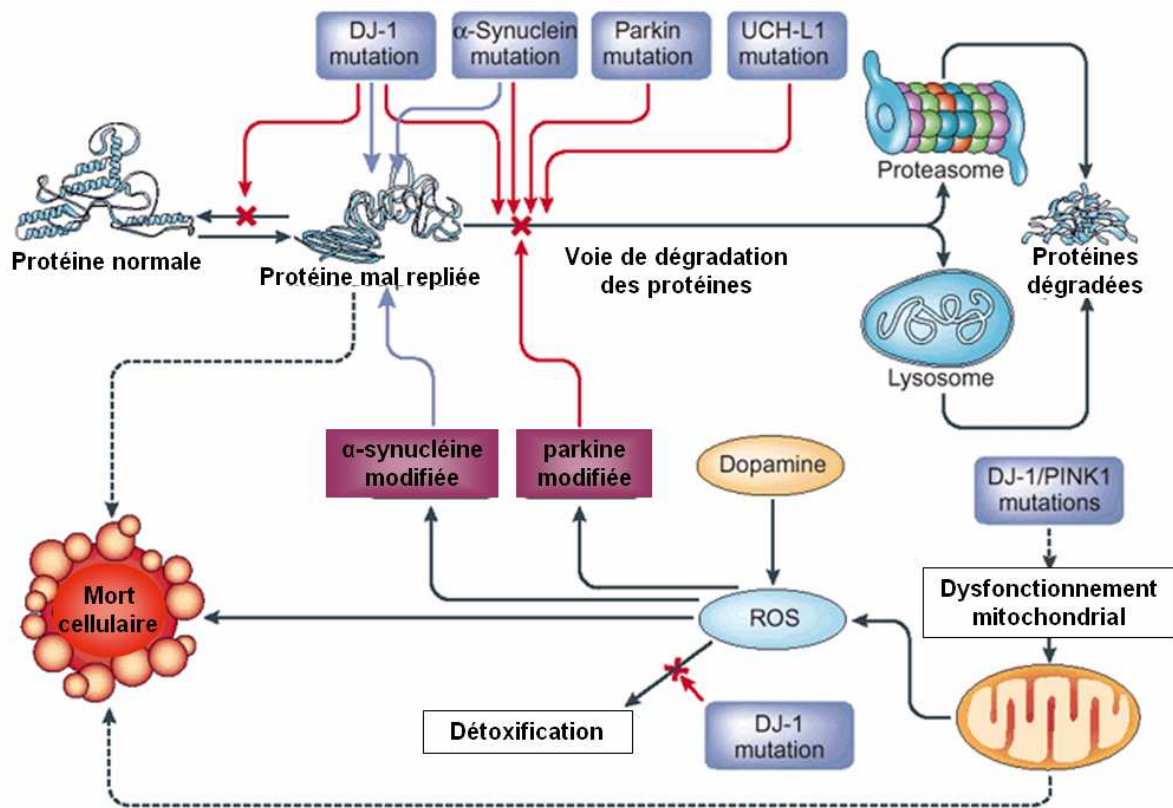


Figure 21. Le mauvais repliement des protéines et la neurodégénérescence dans la maladie de Parkinson. L' α -synucléine mutante et DJ-1 sont potentiellement mal repliées, ce qui active la voie ubiquitine-protéasome et l'autophagie. Les autres protéines mutantes, comme la parkine et UCH-L1, perdraient leur fonction. Ces deux protéines qui appartiennent au système ubiquitine-protéasome ne peuvent plus exercer leur activité ubiquitine-ligase en raison de leur mutation, ce qui affecte la machinerie cellulaire qui devient incapable de reconnaître et dégrader les protéines mal conformées. Les mutations de DJ-1 altèreraient également son activité de chaperonne en l'empêchant de replier les protéines endommagées ou de les adresser à la dégradation (flèches rouges). Ces différentes altérations pourraient provoquer l'accumulation de protéines indésirables qui, par des mécanismes inconnus, (flèches en pointillés) entraîneraient la neurodégénérescence. Le stress oxydatif généré par un dysfonctionnement mitochondrial et le métabolisme de la dopamine serait également à l'origine du mauvais repliement des protéines, en particulier de l' α -synucléine et de la parkine. Le stress oxydatif dans la MP pourrait également provenir de l'incapacité de DJ-1 à détoxifier les espèces réactives de l'oxygène (ROS), alors que le défaut mitochondrial pourrait être en partie provoqué par la mauvaise localisation de DJ-1 et PINK1. Le dysfonctionnement mitochondrial, le stress oxydatif et le mauvais arrangement des protéines seraient donc étroitement interconnectés, si l'on en croit cette « cascade pathogène » putative.

D'après (Vila & Przedborski, 2004).

V.5.2 Dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydant

L'hypothèse qu'un défaut de phosphorylation oxydative joue un rôle dans la physiopathologie de la MP est appuyée par la découverte du blocage par le MPTP de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons par inhibition du complexe I (Nicklas *et al.*, 1987). Plusieurs études ont identifié une activité anormale du complexe I dans la MP (Greenamyre *et al.*, 2001). Son inhibition augmente la production de ROS qui peuvent former des radicaux hydroxyles toxiques ou réagir avec l'oxyde nitrique pour former du peroxynitrite. Ces molécules sont susceptibles d'endommager la cellule en réagissant avec les acides nucléiques, les protéines et les lipides. Une cible de ces espèces réactives serait la chaîne respiratoire elle-même (Cohen, 2000).

Les neurones dopaminergiques seraient un environnement particulièrement favorable à la génération de ROS. En effet, le métabolisme de la dopamine produit lui-même des radicaux superoxydes et du peroxyde d'hydrogène et l'auto-oxydation de la dopamine aboutit à la formation de dopamine-quinone (Graham, 1978) qui altère les autres protéines en réagissant avec leurs cystéines. La dopamine jouerait donc un rôle charnière dans la sensibilité des neurones dopaminergiques aux attaques oxydatives.

V.6 Les modèles animaux pharmacologiques

Les modèles animaux de la MP devraient théoriquement pouvoir répondre aux critères suivants : similarité des mécanismes à l'origine du processus dégénératif, reproduction des symptômes cliniques et anatomopathologiques, caractère prédictif des effets des traitements testés. En pratique, aucun modèle n'est jamais complet. Bien que les modèles animaux de la MP possèdent tous en commun une lésion du système dopaminergique nigrostriatal, la majorité d'entre eux présentent au moins deux limites. D'abord, l'âge des animaux utilisés n'est pas comparable à celui des patients. Ensuite, le protocole employé pour induire les lésions dopaminergiques ne reproduit pas la mise en place progressive du phénomène dégénératif de la maladie (Féger *et al.*, 2002). Il existe différents types de modèles de la MP dont les principaux sont les modèles génétiques et les modèles produits par injection de neurotoxine. Les modèles génétiques, qui ne seront pas traités ici, ont essentiellement été développés chez la souris et portent sur la surexpression ou au contraire l'absence d'expression (*knock-out*) du gène codant pour l'alpha-synucléine, impliqué dans les formes génétiques de la MP.

Les deux neurotoxines les plus couramment employées pour induire un déficit dopaminergique sont le 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) et la 6-hydroxydopamine (6-OHDA).

V.6.1 MPTP

En 1982, de jeunes toxicomanes développent un syndrome parkinsonien précoce, rapidement mis en relation avec l'injection intraveineuse d'une préparation artisanale de 1-méthyl-4-phenyl-4-propion-oxypiperidine (MPPP), un analogue d'un narcotique, la mépéridine (Langston *et al.*, 1983). La substance responsable de la contamination neurotoxique est le MPTP produit par inadvertance lors de la synthèse illicite de MPPP dans un laboratoire rudimentaire. Chez le singe et l'homme, le MPTP produit un syndrome parkinsonien sévère et irréversible, comportant toutes les caractéristiques de la MP, dont le tremblement, la rigidité, la lenteur des mouvements et l'instabilité posturale.

V.6.1.1 Mécanismes d'action

Le MPTP traverse aisément la barrière hémato-encéphalique pour être oxydé en un intermédiaire instable, le 1-méthyl-4-phenyl-1,2-dihydropyridinium (MPDP⁺) par une monoamine oxydase B présente essentiellement dans les astrocytes (Di Monte *et al.*, 1991). Le MPDP⁺ s'oxyde alors spontanément en 1-méthyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) qui est libéré dans l'espace extracellulaire par des transporteurs des monoamines présents sur les cellules gliales (Russ *et al.*, 1996). Il pénètre ensuite spécifiquement dans les neurones dopaminergiques en utilisant le transporteur membranaire de la dopamine (TDA) avec la même affinité que celle-ci (*cf.* figure 22) (Javitch *et al.*, 1985). Dans les neurones dopaminergiques, le MPP⁺ peut être séquestré dans des vésicules synaptiques par l'intermédiaire du transporteur vésiculaire de la DA (VMAT), ce qui l'empêche d'exercer son action neurotoxique. Il peut également former des dépôts intracellulaires dans les neurones dopaminergiques en se fixant à la neuromélanine (D'Amato *et al.*, 1986). Ce phénomène expliquerait la sensibilité particulière au MPP⁺ des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (contenant, chez l'homme, de la mélanine) par rapport aux neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale ou de l'aire rétro-rubrale (Herrero *et al.*, 1993). Enfin, le MPP⁺ non séquestré s'accumule dans les mitochondries où il inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire induisant ainsi un déficit énergétique, une perte de l'homéostasie calcique et une augmentation de la production de radicaux libres, menant à la mort de la cellule.

V.6.1.2 Protocoles d'intoxication

Le MPTP est principalement utilisé chez les primates non-humains et la souris, mais également chez d'autres espèces comme le chien, le chat, le rat et le poisson (Schober, 2004). En fonction de l'espèce chez laquelle la toxine est utilisée, le mode d'administration du MPTP peut différer. En principe, le MPTP peut être fourni de façon diverse comme le gavage ou les injections stéréotaxiques, mais le mode d'administration le plus répandu et reproductible est l'injection systémique (*e.g.* intramusculaire, intrapéritonéale, intraveineuse ou sous-cutanée) (Przedborski *et al.*, 2001). A l'heure actuelle, le singe intoxiqué au MPTP est le modèle le plus utile pour les tests comportementaux (Schober, 2004), alors que pour les modifications neurochimiques, c'est la souris qui semble la plus appropriée (Schmidt & Ferger, 2001).

Chez la souris, l'injection systémique ou intracrâniale de MPTP peut aboutir au dysfonctionnement du système dopaminergique nigrostriatal, incluant des symptômes de perturbation du contrôle de la motricité ressemblant à ceux des patients parkinsoniens, comme l'akinésie, la rigidité, le tremblement, les anomalies de la marche et de la posture (Sedelis *et al.*, 2001). Chez la souris intoxiquée au MPTP, il est connu que la perte des neurones dopaminergiques engendre des troubles de la neurotransmission dopaminergique qui s'accompagnent au niveau striatal par une perte des terminaisons dopaminergiques et des niveaux de dopamine. La perte cellulaire dans la SNc s'accompagne quant à elle d'une augmentation du nombre de neurones immunoréactifs pour l'alpha-synucléine (Vila *et al.*, 2000) et du nombre d'ARNm de l'alpha-synucléine (Kuhn *et al.*, 2003). Cependant, lorsque les animaux traités aux MPTP développent des corps d'inclusion d'alpha-synucléine, ces agrégats ne reproduisent pas la structure des corps de Lewy (Maries *et al.*, 2003).

Le mode d'administration du MPTP chez la souris a été mis en relation avec le mode de mort neuronale dans la substance noire : les traitements chroniques provoquent une mort par apoptose des neurones dopaminergiques (Tatton & Kish, 1997), alors que les traitements aigus entraînent leur mort nécrotique (Jackson-Lewis *et al.*, 1995).

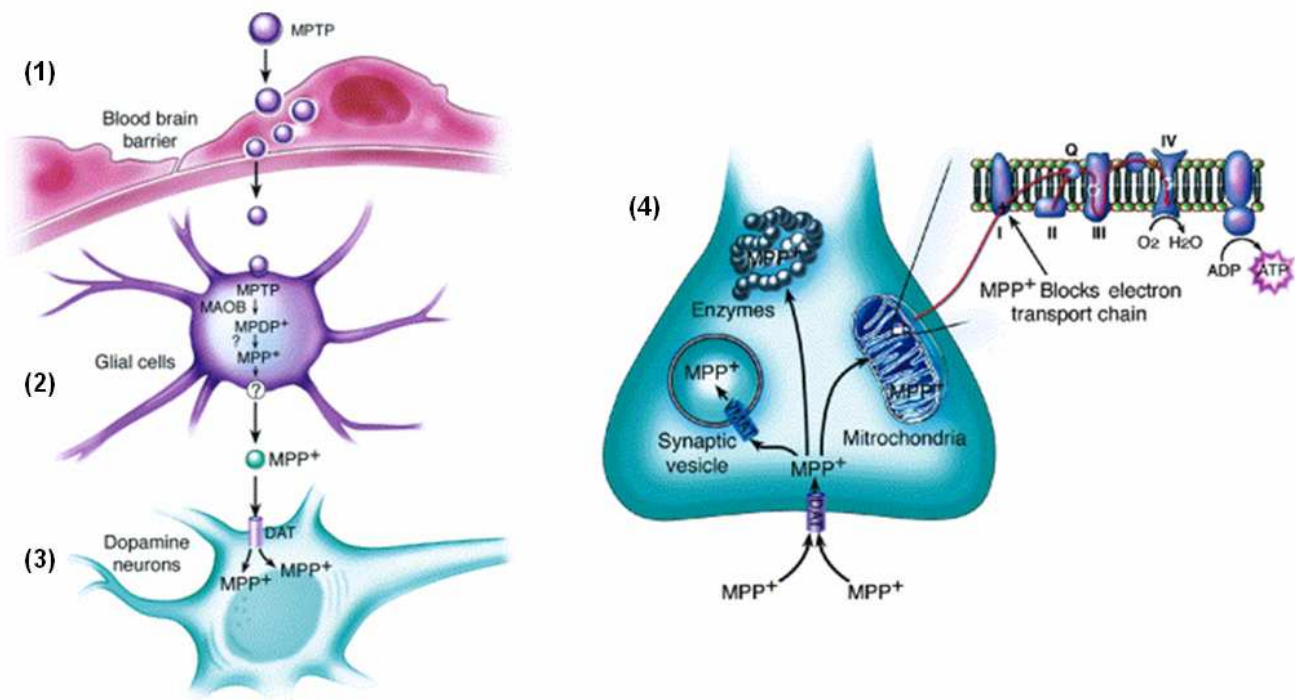


Figure 22. Représentation schématique des mécanismes d'action du MPTP. (1) Le MPTP franchit facilement la barrière hémato-encéphalique. (2) Il pénètre dans les cellules astrocytaires où il est oxydé en MPDP⁺ par l'enzyme mitochondriale MAO-B, puis est converti en MPP⁺ et sort de la cellule par un mécanisme inconnu. (3) Le MPP⁺ entre dans les neurones dopaminergiques en empruntant le transporteur de dopamine (DAT) pour lequel il a une forte affinité. (4) A l'intérieur du neurone dopaminergique, le MPP⁺ peut être séquestré dans des vésicules, altérer les protéines en provoquant leur nitration ou encore pénétrer dans la mitochondrie et bloquer la chaîne respiratoire en interférant avec le complexe I. A terme, la baisse de production d'ATP induit une augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène dans la cellule et la production de peroxyde d'hydrogène et de radicaux libres, ce qui aboutit à la mort du neurone.

D'après Dauer & Przedborski, 2003.

La souris est devenue l'organisme le plus couramment utilisé pour étudier le traitement au MPTP, à la fois pour des raisons techniques et économiques (Przedborski *et al.* 2001; Schmidt and Ferger 2001). Cependant, plusieurs limites doivent être prises en considération : les souris sont moins sensibles au MPTP que les primates, ce qui nécessite l'administration de doses plus importantes pour obtenir une perte significative des neurones dopaminergiques. De plus, elles ne développent pas de symptômes moteurs persistants et progressifs (Przedborski *et al.* 2001). Enfin, le degré d'altération du système dopaminergique est évidemment dépendant de la dose administrée et de la fréquence d'intoxication (Schmidt & Ferger, 2001; Sonsalla & Heikkila, 1986). La fréquence d'intoxication influence la vitesse de lésion de la voie nigrostriatale mais fournit aussi un aperçu des mécanismes pathologiques de la MP, comme l'induction et la manifestation de la mort neuronale (nécrotique/apoptotique), cette dernière semblant corrélée à différents stades de la maladie (présymptomatique, stades précoce, progressif et final).

Selon Schmidt et Ferger (2001), les modèles MPTP décrits pour la souris se répartissent en quatre catégories :

- 1- Le modèle présymptomatique de la MP, particulièrement adapté à l'étude des mécanismes de compensation. Le MPTP doit être administré de façon aiguë et à petites doses (*e.g.* 1x10-20 mg/kg).
- 2- Le modèle pour le stade précoce de la maladie (Jackson-Lewis *et al.* 1995) qui requiert un traitement aigu avec une dose moyenne de MPTP (*e.g.* 4x20 mg/kg à intervalle de 2h). Ce mode d'administration, qui provoque une dégénérescence dopaminergique rapide et une mort cellulaire essentiellement nécrotique, est celui que nous avons utilisé pour modéliser la MP dans nos travaux.
- 3- Le modèle subchronique de la MP (Tatton and Kish 1997) qui nécessite une à deux injections de 20-30 mg/kg de MPTP pendant au moins 5 jours. Ce modèle provoque une dégénérescence tardive du système dopaminergique nigrostriatal avec une mort apoptotique des neurones de la SNc.
- 4- Le modèle chronique progressif de la MP (Bezard et al 1997) basé sur l'injection quotidienne d'une faible dose de MPTP (*e.g.* 4 mg/kg) pendant 20 jours. Ce modèle reflète le profil de progression supposé de la MP et est utile pour les études de neuroprotection et les mécanismes compensatoires.

En résumé, la comparaison de ces modèles indique que des modes variés d'administration du MPTP miment plusieurs stades de la MP et provoquent différents mécanismes de mort neuronale.

La pertinence de l'intoxication de souris au MPTP comme modèle de la MP est sujet à de nombreuses discussions. Aucune étude n'a jamais décrit l'apparition de corps de Lewy chez les rongeurs traités au MPTP, ce qui indique une différence majeure dans les mécanismes pathologiques entre le parkinsonisme induit par le MPTP et la MP idiopathique (Hirsch *et al.*, 2003). De plus, les souris ne présentent qu'une altération comportementale transitoire qui correspondrait à un bref effet toxique du MPTP. Elles souffrent d'hypersalivation, de convulsions, de pilo-érection et d'hypokinésie, mais se rétablissent en 24-48 h (Schmidt & Ferger, 2001). Enfin, les altérations provoquées par le MPTP chez la souris surviennent dans un délai de l'ordre du jour ou de la semaine, alors que la MP se développe sur plusieurs décennies (Schmidt & Ferger, 2001).

V.6.2 6-OHDA

V.6.2.1 Mécanismes d'action

La 2,4,5 trihydroxyphenethylamine, ou 6-hydroxydopamine (6-OHDA) est un analogue de la dopamine (*cf.* figure 23). Introduit il y a une quarantaine d'années, le rat intoxiqué à la 6-OHDA est le premier modèle animal de la MP associé avec la mort des neurones dopaminergiques de la SNc (Ungerstedt, 1968). Bien que la pathologie induite par la 6-OHDA soit différente de la MP, cette toxine est encore largement utilisée. Plusieurs études suggèrent une production physiologique de 6-OHDA par la substance noire, ce qui renforce l'intérêt pour ce modèle. La production intracellulaire de 6-OHDA impliquerait des mécanismes non enzymatiques faisant intervenir la dopamine, le peroxyde d'hydrogène et le fer libre (Jellinger *et al.*, 1995), composés présents en forte concentration dans les neurones dopaminergiques. Cette production de 6-OHDA serait amplifiée : *i*) par la mélanine, présente dans les cellules nigrales sensibles au processus dégénératif et capable d'accroître les taux de fer libre en le libérant de la ferritine ; *ii*) par la fraction de fer libéré de la ferritine par la neurotoxine elle-même (Rocha *et al.*, 2000) ; et également *iii*) par les ions nitrites et le manganèse, eux-mêmes impliqués dans la dégénérescence nigrale. Chez le patient parkinsonien, la production nigrale de 6-OHDA serait accrue du fait d'une augmentation pathologique des taux de radicaux libres et de fer mais aussi par le traitement par la levodopa (Andrew *et al.*, 1993a). *In vitro*, l'utilisation de modèles expérimentaux faisant appel à

diverses lignées cellulaires catécholaminergiques (lignées PC12, SY5Y, SKNSH, MN9D...) ou à des cultures primaires de neurones mésencéphaliques, a permis de démontrer que la toxicité de la 6-OHDA était principalement liée à sa capacité d'engendrer de fortes quantités de radicaux libres. D'autres études ont confirmé ces résultats *in vivo* (Blum *et al.*, 2001; Gerlach & Riederer, 1996).

L'action de la 6-OHDA est relativement ciblée puisqu'elle est restreinte aux neurones monoaminergiques en raison de son captage préférentiel par les transporteurs dopaminergiques et noradrénergiques (Luthman *et al.*, 1989). Dans les neurones, la 6-OHDA s'accumule dans le cytosol, génère des ROS et inactive les macromolécules biologiques en générant des quinones qui s'attaquent aux groupes nucléophiles (Cohen, 1994) (*cf.* figure 24).

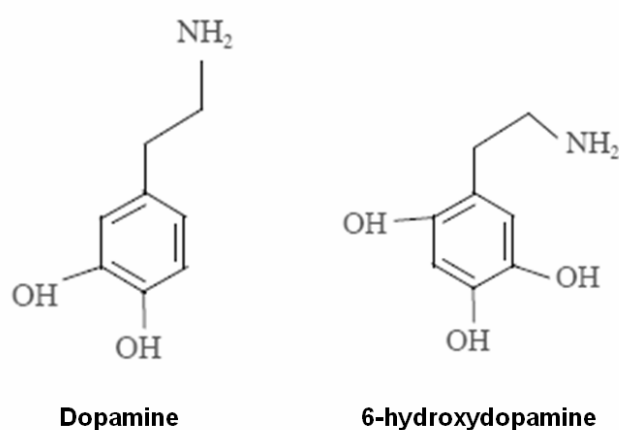


Figure 23. Structure moléculaire de la dopamine et de son analogue hydroxylé, la 6-hydroxydopamine.

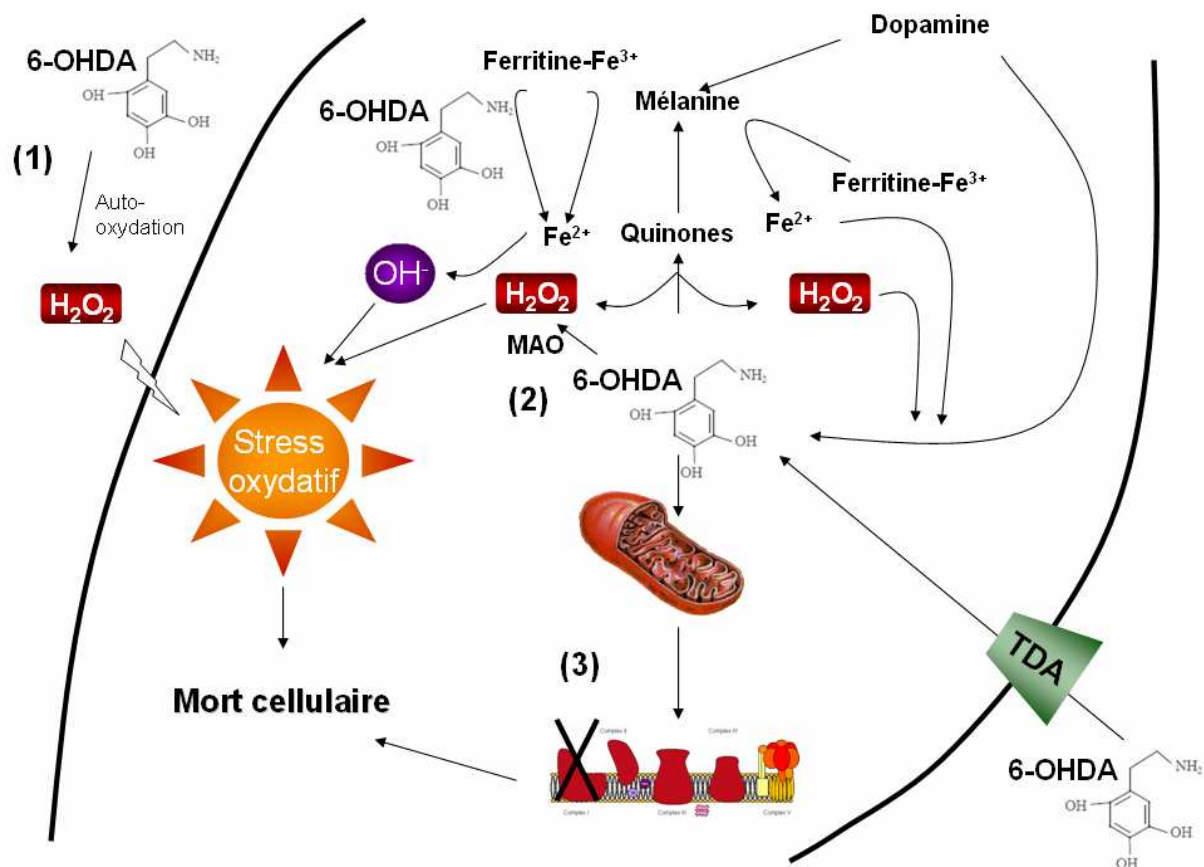


Figure 24. Mécanismes potentiels de toxicité de la 6-hydroxydopamine. La 6-OHDA pourrait induire la mort des cellules catécholaminergiques par trois mécanismes principaux : (1) par la génération d'espèces réactives de l'oxygène par une auto-oxydation intra- ou extracellulaire ; (2) par la formation de peroxyde d'hydrogène induite par l'activité de la MAO (monoamine-oxydase) ; (3) par une inhibition directe de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces événements conduisent à un fort stress oxydatif amplifié par une baisse de la quantité d'ATP disponible, et conduisent à la mort cellulaire. TDA : transporteur de dopamine.

Adapté de Blum et al., 2001.

V.6.2.2 Mode d'administration

En raison de l'incapacité de la 6-OHDA à traverser la barrière hémato-encéphalique, elle doit être administrée localement par injection stéréotaxique dans la substance noire, le faisceau médian du télencéphale basal (FMT, qui porte les projections dopaminergiques et serotoninergiques ascendantes vers le télencéphale), ou dans le striatum pour atteindre la voie dopaminergique nigrostriatale (Javoy *et al.*, 1976). Après injection dans la SN ou le FMT, les neurones dopaminergiques commencent à dégénérer dans les 24h et meurent sans phénotype apoptotique (Jeon *et al.*, 1995). Lorsqu'elle est injectée dans le striatum, la 6-OHDA produit une dégénérescence rétrograde des neurones nigrostriataux qui prend fin en 1 à 3 semaines (Sauer & Oertel, 1994). L'extension de la lésion dopaminergique engendrée peut être quantifiée par l'administration périphérique d'apomorphine ou d'amphétamine qui produit un comportement rotatoire transitoire chez les animaux ayant une lésion unilatérale, comportement pris pour index du degré de dégénérescence neuronale (Gerlach & Riederer, 1996).

Les lésions bilatérales présentent l'avantage de mimer au plus près la dégénérescence observée chez les patients parkinsoniens dans les stades avancés de la maladie et préviennent la survenue de possibles effets compensatoires induits par le côté intact contralatéral. Cependant, elles sont moins utilisées que les lésions unilatérales car elles entraînent une aphagie et une adipsie sévères chez les animaux et ainsi un taux de perte élevé (Ungerstedt, 1971). De plus, elles n'induisent pas d'asymétrie comportementale et ne permettent donc pas d'évaluer l'efficacité de la lésion par les tests comportementaux de rotations pharmacologiquement induites. Enfin, elles ne permettent pas à chaque animal d'être son propre témoin. Cependant, l'utilisation du côté non lésé comme témoin du côté lésé doit se faire avec précaution. En effet, la lésion unilatérale d'une partie du système dopaminergique peut entraîner des modifications d'activité des structures contralatérales saines (White-Cipriano et Waszczak, 2005).

En conclusion, le modèle 6-OHDA possède de nombreux avantages tenant notamment à l'espèce utilisée et à la bonne reproductibilité de la lésion. Cependant, ce modèle présente des différences majeures avec la pathologie humaine : la lésion n'affecte pas uniquement les neurones dopaminergiques, la mort neuronale n'est ni progressive ni corrélée à la présence de corps de Lewy. Enfin, les modifications comportementales ne sont que partiellement comparables avec la symptomatologie de la MP.

CHAPITRE I – CARACTERISATION D'UN NOUVEAU MARQUEUR DU STRIATUM CHEZ LA SOURIS : CAPUCINE

I INTRODUCTION

Une première étude des transcriptomes du cortex somatosensoriel, du striatum et du noyau accumbens par SAGE (de Chaldee *et al.*, 2003) avait permis de mettre en évidence l'expression différentielle de 135 transcrits dans ces régions. Parmi eux, le tag StM20, qui est particulièrement abondant dans le striatum, possédait une occurrence dans le cluster UniGene Mm.152484 qui ne contenait aucun ADNc dont la région codante soit complète.

L'étude présentée ici a tout d'abord consisté à cloner l'ADNc correspondant au tag StM20, puis à définir la structure du gène dont il était issu.

La distribution de l'ARNm dans le cerveau de souris a ensuite été explorée. Dans un premier temps, nous avons utilisé la technique de RT-PCR quantitative pour mesurer l'expression du gène dans 13 régions cérébrales. Son expression prédominante dans le caudé-putamen a conduit à baptiser ce gène *capucine*, pour *caudate-and putamen-enriched sequence*. Afin de mener une étude fine de la distribution du transcrit dans le cerveau, nous avons appliqué la technique d'hybridation *in situ*, qui nous a permis de détecter son expression dans des régions jusqu'alors inexplorées, tant par SAGE que par RT-PCR quantitative.

Pour tenter d'approcher la fonction de *capucine*, nous avons dans un premier temps recherché des orthologues du gène et de la protéine dans d'autres espèces de mammifères. Ensuite, l'expression de *capucine* en fusion avec le gène codant l'EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) dans des cellules CHO et Hela a permis de déterminer la localisation subcellulaire de la protéine. Enfin, *capucine* étant préférentiellement exprimé dans le striatum qui est la cible privilégiée de la maladie de Huntington, nous avons testé son expression dans deux modèles murins de la maladie.

**II PUBLICATION N°1 : « CAPUCIN : A NOVEL STRIATAL MARKER DOWN-
REGULATED IN RODENT MODELS OF HUNTINGTON DISEASE »**

III DISCUSSION

Le travail présenté ici est une illustration de la puissance de l'analyse SAGE qui offre la possibilité de découvrir de nouveaux transcrits. Avant cette étude, aucun ADNc correspondant à *capucine* n'avait été déposé dans les bases de données.

L'analyse de la séquence de *capucine* n'a révélé aucun domaine fonctionnel connu dans sa partie N-terminale. Sa région C-terminale, en revanche, partage des homologies avec la famille des protéines transmembranaires induites par les interférons (*IFITM*). Il a été montré que l'expression des gènes codant cette famille de protéines était régulée par la voie de signalisation Wnt/beta-caténine dans l'épithélium intestinal (Andreu *et al.*, 2006) et au cours de la gastrulation chez la souris (Lickert *et al.*, 2005). Par ailleurs, une publication récente évoque le rôle antiprolifératif d'*IFITM1* en réponse à l'interféron gamma (Yang *et al.*, 2007) par une voie dépendante du suppresseur de tumeur p53. La localisation d'une fusion de Capucine avec l'EYFP dans l'appareil de Golgi de deux lignées cellulaires de mammifères n'est pas incompatible avec l'implication potentielle de la protéine dans une voie de signalisation. On trouve notamment dans la littérature la preuve d'une activation de la forme « golgienne » de Ras lors de la signalisation par les facteurs de croissance (Chiu *et al.*, 2002).

La découverte par SAGE, puis la confirmation par RT-PCR quantitative, de l'expression préférentielle de *capucine* dans le striatum fournit également un indice sur ses fonctions potentielles au sein du système nerveux. Le striatum est la principale structure d'entrée des ganglions de la base. Il est divisé en deux ensembles fonctionnellement distincts : *i*) le striatum ventral qui reçoit des afférences cortico-limbiques et est impliqué dans les systèmes de récompense et de motivation ; *ii*) le striatum dorsal, majoritairement innervé par le cortex sensorimoteur, qui est impliqué dans le contrôle de la motricité volontaire. L'hybridation *in situ* a montré que *capucine* était surtout exprimé dans la partie dorsolatérale du striatum qui, comme nous l'avons abordé en introduction de ce mémoire, est la cible des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte. Par ailleurs, l'expression de *capucine* a été détectée dans la région *shell* des glomérules olfactifs, les noyaux antérodorsaux et paraventriculaires du thalamus, et l'habenula médiane, qui sont directement connectés aux neurones dopaminergiques, ou expriment des protéines impliquées dans la transmission dopaminergique.

Etant donné la spécificité de son profil d'expression, il était pertinent d'explorer la fonction de *capucine* dans un contexte physiopathologique affectant spécifiquement le striatum. Nous avons donc étudié la régulation de son expression dans deux modèles de la maladie de Huntington caractérisée par la dégénérescence des neurones striataux : la souris

transgénique R6/2 (Mangiarini *et al.*, 1996) et une culture primaire de neurones infectés par un lentivirus (Zala *et al.*, 2005). L'abondance de l'ARNm de *capucine* est significativement diminuée dans les deux modèles, indiquant une baisse du niveau d'expression du gène ou de la stabilité du transcrit. La baisse du niveau d'expression de marqueurs connus du striatum tel que les récepteurs dopaminergiques D1 et D2, l'enképhaline et la substance P a déjà été remarquée lors d'études *post-mortem* de noyau caudé de patients atteints par la MH (Augood *et al.*, 1997; Augood *et al.*, 1996; Richfield *et al.*, 1995). De plus, plusieurs études par puces à ADN menées chez des modèles et des patients atteints de la MH, montrent une régulation préférentielle de l'expression des gènes spécifiquement exprimés dans le striatum plutôt que dans d'autres régions cérébrales (Desplats *et al.*, 2006; Hodges *et al.*, 2006).

En résumé, *capucine* est un nouveau transcrit, que nous avons précédemment identifié lors d'une étude transcriptomique du striatum par SAGE (de Chaldee *et al.*, 2003). En raison de son pattern d'expression, il est possible que *capucine* soit exprimé dans les neurones de projection du striatum ; un double marquage *in situ* permettrait de s'en assurer en utilisant par exemple une sonde susceptible de s'hybrider avec l'ARNm de la préproenképhaline 1, exprimée dans une partie des neurones de projection épineux moyens du striatum. De plus, il est également envisageable que *capucine* soit impliqué dans la transmission dopaminergique ; cette piste pourrait être explorée en surexprimant, ou au contraire en invalidant *capucine* dans des cultures de neurones striataux. Par ailleurs, la régulation de son expression dans des modèles de la MH laisse supposer que *capucine* pourrait jouer un rôle dans la dégénérescence spécifique des neurones striataux au cours de cette pathologie. L'analyse des effets de l'inactivation ou de la surexpression de *capucine* sur la sensibilité des cellules striatales à la huntingtine mutée, pourrait permettre d'identifier de nouveaux mécanismes dans le processus pathologique de la MH. Enfin, l'étude de l'inactivation du gène constitue sans doute une approche complémentaire de ses fonctions biologiques.

CHAPITRE II – ETUDE DES TRANSCRIPTOMES DE DIFFERENTES REGIONS CEREBRALES PAR ANALYSE EN SERIE DE L'EXPRESSION DES GENES

I INTRODUCTION

L'analyse à grande échelle de l'expression des gènes dans le cerveau est une approche puissante et relativement nouvelle, susceptible de nous permettre d'identifier des gènes candidats pour l'analyse des fonctions cérébrales. Le cerveau est un organe complexe, constitué de nombreuses régions fonctionnellement spécialisées et étroitement interconnectées. La découverte de gènes spécifiquement exprimés dans une sous-région ou un sous-type cellulaire est donc d'un intérêt majeur pour établir une signature moléculaire potentiellement pertinente fonctionnellement.

Bien que la littérature concernant la caractérisation de profils d'expression génique dans le cerveau soit désormais abondante, la grande majorité des études ont été réalisées par puces à ADN. Nous avons donc utilisé la méthode SAGE, qui consiste à séquencer des étiquettes d'ADNc produites à partir d'une population d'ARN messagers, pour établir un profil d'expression quantitatif de 11 régions cérébrales, dont plusieurs régions corticales, le noyau accumbens, le striatum, le thalamus, la substance noire et l'aire tegmentale ventrale. Ces régions sont pour la plupart connues pour être impliquées dans des pathologies psychiatriques (comme la schizophrénie et la dépendance pour le cortex préfrontal et l'aire tegmentale ventrale) aussi bien que neurodégénératives (comme la maladie de Huntington pour le striatum, la maladie de Parkinson pour la substance noire, ou encore la maladie d'Alzheimer pour les régions corticales, dont le cortex entorhinal). La caractérisation des profils d'expression génique de ces régions présente donc un intérêt évident dans la compréhension de ces pathologies.

La comparaison des banques SAGE a mis en évidence des gènes différentiellement exprimés dans le cerveau de souris. Ces données ont été validées par la RT-PCR quantitative.

Le cerveau étant un organe de composition hétérogène, nous avons voulu identifier les types cellulaires dans lesquels les marqueurs sont exprimés. La mise en place d'une technique combinant l'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie a permis d'étudier la distribution cellulaire des ARNm de trois marqueurs mésencéphaliques.

Nous avons également entrepris d'étendre à l'homme les analyses d'expression réalisées chez la souris. L'expression des marqueurs régionaux a donc été testée par RT-PCR quantitative dans des régions cérébrales humaines.

Par ailleurs, en considérant que l'expression régionale des gènes a une pertinence fonctionnelle, nous avons étudié les marqueurs striataux et mésencéphaliques dans le contexte de dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire. Nous avons ainsi testé deux modèles pharmacologiques de la maladie de Parkinson : le rat traité à la 6-hydroxydopamine, et la souris traitée au MPTP. Enfin, nous avons analysé les niveaux d'expression des gènes préférentiellement exprimés dans le striatum et le cortex dans un modèle de la maladie de Huntington : la souris transgénique R6/2.

II ANALYSE DES BANQUES SADE ET LongSADE

II.1 Analyse des séquences

Les séquences des clones sont déposées dans le logiciel SadeLAB (Chabardès-Garonne *et al.*, 2003). Ce logiciel permet de trier les séquences selon leur qualité, grâce à une analyse PHRED, qui affecte un score à chaque nucléotide. Les séquences sont ensuite automatiquement acceptées si aucun de leur nucléotide ne présente un score PHRED inférieur à 15. Inversement, elles sont automatiquement rejetées si le score moyen des nucléotides est inférieur à 15, ou si aucun insert n'est détecté. Les séquences de qualité intermédiaire sont vérifiées individuellement pour chaque nucléotide présentant un score PHRED inférieur à 20. Chacun des ditags peut alors être validé, édité pour corriger une lecture erronée, ou éliminé si le chromatogramme révèle une séquence ambiguë.

Les ditags validés sont enregistrés dans une base de données. Le logiciel SadeLAB permet ensuite de trier les tags en fonction de leur séquence, de les quantifier, et fournit des éléments préliminaires d'identification.

II.2 Analyse des tags

II.2.1 Nombre de tags par concatémère

La première estimation de la qualité d'une banque repose sur la longueur des concatémères clonés. Pour que les données soient acquises relativement rapidement et à un coût raisonnable, il faut que les clones comportent en moyenne une dizaine de tags, ce qui correspond à des concatémères de 120 pb pour SADE, et de 170 pb pour LongSADE. Il est à noter que la taille des inserts séquencés ne correspond pas à celle des concatémères purifiés sur gel, qui sont théoriquement plus longs (*cf.* Annexes II.8). Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat : les inserts les plus longs sont connus pour avoir la moins bonne efficacité de clonage et sont supposés contenir des répétitions ce qui génère des constructions plasmidiques instables.

II.2.2 Tags correspondant aux adaptateurs

Une catégorie de séquences à exclure de l'analyse correspond aux ditags qui contiennent les séquences des adaptateurs – GTCCCTGTGC et GTCCCTTCCG pour le protocole SADE ; GTCGGACCTGTGCTG et GTCGGACCTTAGACT pour le protocole 95

LongSADE. Etant peu probable d'obtenir de telles séquences adjacentes à un site *Sau3AI*, l'origine de l'ensemble de ces tags est attribuée à des séquences d'adaptateurs. Ces séquences qui ne présentent pas d'intérêt biologique sont exclues de l'analyse. La proportion de séquences d'adaptateurs est également un indice de la qualité de la librairie. Une banque contaminée par 10 à 15% de séquences d'adaptateurs est de qualité passable, de 5 à 10%, de bonne qualité, et en-dessous de 5%, la banque est excellente (Cheval *et al.* 2000). Dans notre étude, la proportion de tags correspondant à des séquences d'adaptateurs est inférieure à 5 % à l'exception de trois banques (*cf.* table 4).

	Tags séquencés	Nombre moyen de tags par insert	Ditags dupliqués	Adaptateurs	Tags validés	Tags distincts	Tags représentés une fois
Cerveau entier*	209 876	19,6	13.6 %	0.8 %	193 339	61 509	69%
Cortex Orbitaire*	91 928	8,4	13.5 %	0.7 %	82 486	30 885	73%
Cortex Prélimbique*	77 196	6,9	11.7 %	0.7 %	68 470	27 590	74%
Cortex Cingulaire*	176 552	17,9	9.9 %	0.7 %	158 937	54 338	72%
Cortex Moteur*	152 802	15,1	10.0 %	0.5 %	137 856	47 515	71%
Cortex Somesthésique	83 814	13	7.6 %	13.2 %	67 985	25 416	70%
Cortex Entorhinal	193 890	15,5	9.6 %	4.4 %	172 144	53 354	66%
Caudé-Putamen	90 706	13,7	9.0 %	10.2 %	73 657	25 114	70%
Noyau accumbens	109 032	15,4	8.7 %	8.7 %	89 577	29 279	68%
Thalamus	97 038	13,3	2.8 %	2.8 %	61 332	24 402	71%
Substance noire*	88 168	8,4	12.8 %	1.0 %	77 651	30 394	73%
Aire tegmentale ventrale*	94 436	10,2	8.4 %	1.4 %	86 247	32 397	73%

Table 4. Caractéristiques générales des banques SADE et LongSADE. Les astérisques indiquent les banques générées avec le protocole LongSADE.

II.2.3 Ditags dupliqués

En raison de la complexité du pool d'ARNm, la probabilité qu'un même ditag se forme plus d'une fois est quasi-nulle. Expérimentalement, il apparaît toutefois que certains ditags sont détectés de façon répétée dans une librairie. Une proportion importante de ditags répétés indique une banque de faible complexité. Notre étude ne concernant que des échantillons moléculairement complexes, la présence de ces ditags répétés est attribuable à trois facteurs : *i*) une quantité trop faible de cellules analysées, ce qui diminue la complexité de l'échantillon ; *ii*) la perte de matériel au cours des nombreuses étapes de la construction de la banque ; *iii*) l'amplification préférentielle de certains ditags amplifiés lors des étapes de PCR.

Pour ces raisons, nous avons adopté la stratégie de Velculescu *et al.* (1995), qui consiste à exclure de l'analyse les ditags présents plusieurs fois (*cf.* table 4).

II.2.4 Tags attribués à des erreurs de séquence

En comparant des tags entre eux, nous avons mis en évidence des tags de séquences voisines, c'est-à-dire différant l'une de l'autre par la substitution, l'insertion ou la délétion d'un nucléotide (*cf.* table 5). Le tag le plus abondant est appelé tag « canonique » et est conservé dans l'analyse, au contraire des tags « voisins » d'abondance plus faible, probablement attribuables à des séquences erronées, qui sont exclus.

En pratique, le cas le plus fréquemment rencontré correspond à la délétion du nucléotide 5' du tag (*cf.* table 5). Une amélioration récente du logiciel d'analyse permet de d'exclure ces séquences de façon automatique (*cf.* table 6).

Tag canonique	AAACCTACCAGCCGG	176
Délétion		
du nucléotide 5'	AACCTACCAGCCGGT	11
d'un autre nucléotide	AAACCTACAGCCGGT	1
Monosubstitution		
du nucléotide 3'	AAACCTACCAGCCGC	4
	AAACCTACCAGCCGA	3
d'un autre nucléotide	AGACCTACCAGCCGG	2
	AAACCTACCAGTCGG	2
	AAACCTACCGGCCGG	1
	AAACCTGCCAGCCGG	1
	AAATCTACCAGCCGG	1
	AAACCTACCAGCCAG	1
	AAACCTACCAACCGG	1
	AAACCTACCAGCCCG	1
Insertion	CAAACCTACCAGCCG	1

Table 5. Tags « voisins » dont la séquence diffère de celle du tag canonique par un nucléotide. Exemple de la tyrosine hydroxylase dans la banque d'aire tegmentale ventrale. La dernière colonne présente l'abondance des tags dans la banque normalisée à 80 000 tags.

	Nombre de tags différents	Nombre de tags différents sans les voisins par délétion du nucléotide 5'	Voisins par délétion du nucléotide 5' (%)
Cortex Somesthésique	25416	23768	6,5
Noyau accumbens	29279	27315	6,7
Caudé-Putamen	25114	23408	6,8
Aire tegmentale ventrale*	32397	29671	8,4
Cortex Prélimbique*	27590	25152	8,8
Cortex Orbitaire*	30885	27678	10,4
Substance noire*	30394	27233	10,4
Cortex Cingulaire*	54338	47849	11,9
Cortex Moteur*	47515	41731	12,2
Thalamus	24402	21317	12,6
Cerveau entier*	61509	53535	13,0
Cortex Entorhinal	53354	42075	21,1

Table 6. Proportion de voisins par délétion du nucléotide 5' contenus dans l'ensemble des banques. Les données sont triées par ordre croissant de la proportion de voisins.

II.3 Identification des tags

Une fois triés et quantifiés, les tags dits « validés » sont déposés dans une plate-forme d'analyse où une première annotation automatique est réalisée. Le programme recherche la séquence du tag dans les différentes bases de données d'ADNc préalablement enregistrées à partir de RefSeq et GenBank. L'identification des tags dont la séquence possède une entrée dans ces bases de données est alors affichée, et le logiciel permet également à l'expérimentateur de s'assurer que le tag est à la « bonne position » sur l'ADNc (c'est à dire immédiatement en 3' du site de restriction de l'enzyme d'ancrage le plus en 3' sur l'ADNc). Par ailleurs, une amélioration récente du logiciel permet désormais d'avoir un contrôle automatique de l'orientation du tag sur la séquence d'ADNc. En effet, un certain nombre de tags sont en position antiparallèle, c'est-à-dire en 5' du site de restriction de l'enzyme d'ancrage. De tels tags ont été mis en évidence dans l'analyse réalisée ici, mais nous avons choisi de ne pas les traiter dans ce contexte.

Après cette étape d'identification automatique, un certain nombre d'annotations sont absentes ou ambiguës. Chaque expérimentateur réalise alors des recherches supplémentaires pour identifier les tags.

L'alignement sur le génome et les bases de données d'EST s'avère très utile pour identifier les tags « orphelins », mais cette dernière méthode n'est réellement envisageable que pour les tags longs, les tags de 14 pb n'étant pas suffisamment spécifiques (27

alignements possibles sur le génome en moyenne, contre seulement 1,3 pour les tags de 21 pb).

Par ailleurs, le processus SAGE comprenant plusieurs étapes potentiellement génératrices d'artéfacts (par exemple, une digestion partielle des ADNc génèrera différents tags SAGE pour le même transcrit), un certain nombre de tags, dont la proportion est difficile à déterminer, correspond à des séquences « indésirables » qui doivent souvent être annotées manuellement.

Enfin, certains tags demeurent non identifiés après analyse manuelle (une banque SAGE en contiendrait jusqu'à la moitié selon la littérature ; (Ge *et al.*, 2006)). Ces tags peuvent correspondre à des espèces moléculaires encore inconnues, ou provenir d'une accumulation d'erreurs de séquençage qui les rend inutilisables pour reconnaître leur transcrit d'origine.

**III PUBLICATION N°2 – “QUANTITATIVE GENE EXPRESSION PROFILING
OF MOUSE BRAIN REGIONS REVEALS DIFFERENTIAL TRANSCRIPTS
CONSERVED IN MAN AND AFFECTED IN DISEASE MODELS”.**

Quantitative gene expression profiling of mouse brain regions reveals differential transcripts conserved in man and affected in disease models

Camille Brochier,¹ Marie-Claude Gaillard,¹ Elsa Diguët,² Nicolas Caudy,¹ Carole Dossat,³ Béatrice Ségurens,³ Patrick Wincker,³ Emmanuel Roze,⁴ Jocelyne Caboche,⁴ Philippe Hantraye,² Emmanuel Brouillet,² Jean-Marc Elalouf,¹ and Michel de Chaldée¹

¹*Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut de Biologie et Technologies de Saclay (iBiTecS), Service de Biologie Intégrative et Génétique Moléculaire (SBIGeM), Gif-sur-Yvette, F-91191, France;* ²*Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut d'Imagerie Biomédicale (I²BM), Molecular Imaging Research Center (MIRcen), Orsay, F-91401, France;* ³*Genoscope-Centre National de Séquençage (CNS), Evry, F-91057, France;* and ⁴*Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche 7102, 9 quai Saint-Bernard, Paris, F-75005, France*

Running head: Transcriptome analysis of mouse brain regions

Address for reprint requests and other correspondence: J.-M. Elalouf, CEA Saclay, Bâtiment 144, F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France (e-mail: jean-marc.elalouf@cea.fr; tel: +33 1 6908 8022; fax: +33 1 6908 4712) or M. de Chaldée, CEA Saclay, Bâtiment 144, F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France (e-mail: michel.de.chaldee@cea.fr; tel: +33 1 6908 8865; fax: +33 1 6908 4712).

Expression data reported in this paper have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database under accession nos. GSM183639, GSM183640, GSM183644-GSM183653. They can be viewed using elalouf as username, and lascaux2 as password.

ABSTRACT

Using serial analysis of gene expression (SAGE), we collected quantitative transcriptome data in 11 regions of the adult wild-type mouse brain: the orbital, prelimbic, cingulate, motor, somatosensory and entorhinal cortices, the caudate-putamen, the nucleus accumbens, the thalamus, the substantia nigra and the ventral tegmental area. With more than 1.2 million cDNA tags sequenced, this database is a powerful resource to explore brain functions and disorders. As an illustration, we performed inter-regional comparisons and evidenced 308 differential transcripts. Most of them are poorly characterized and 20 % lack functional annotation. For ~ 50 differential transcripts, we provide independent expression level measurements in mouse brain regions by real-time quantitative RT-PCR. We also show examples where we used *in situ* hybridization to achieve infrastructural resolution. For 30 transcripts, we next demonstrated that regional enrichment is conserved in the human brain. We then quantified the expression levels of region-enriched transcripts in the R6/2 mouse model of Huntington disease and the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson disease, and observed significant alterations in the striatum and cortex of R6/2 mice and in the striatum of MPTP-treated mice. These results show that the gene expression data provided here for the mouse brain can be used to explore pathophysiological models and disclose transcripts differentially expressed in human brain regions.

biological markers; neurodegenerative diseases; serial analysis of gene expression

INTRODUCTION

The mammalian brain is organized as a complex network involving a large number of structures. Each of them is primarily identified by its anatomical localization, general morphology and cytoarchitecture, and exhibits a characteristic developmental course and wiring pattern. The establishment and maintenance of these features rely largely on a tight control of gene expression. In the past few years, several large-scale efforts have benefited from the availability of genomic data and technical advances to explore the expression profile of adult mouse brain regions. A variety of strategies have been developed, such as microarray analysis of dissected regions (Sandberg *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2004; Zapala *et al.*, 2005) or voxels (Chin, 2007), high-throughput *in situ* hybridization (Lein *et al.*, 2007; Magdaleno *et al.*, 2006), or replacement of coding sequences by enhanced green fluorescent protein reporter gene in bacterial artificial chromosome transgenic vectors (Gong *et al.*, 2003).

Here we performed serial analysis of gene expression (SAGE) (Velculescu *et al.*, 1995) on 11 regions accurately dissected from the fore- and midbrain of the adult mouse, which have not been considered in earlier SAGE projects (Boon *et al.*, 2004b; Siddiqui *et al.*, 2005), and include territories that are rarely collected due to their small size (*e.g.*, areas of the prefrontal cortex, nucleus accumbens, ventral tegmental area). With more than 1.2 million cDNA tags sequenced, the present work provides, to our knowledge, the most comprehensive quantitative expression database published for adult brain regions.

The SAGE method has the advantage of precisely quantifying each transcript detected in a given sample. We could therefore apply stringent comparison criteria to identify genes preferentially expressed in each brain region and, within each region, we could sort the enriched transcripts by expression level. The resulting lists, curated using data from the literature and complementary experimental approaches, comprise a total of 308 genes, many

of them with no established function. For a subset of 50 transcripts, we additionally measured expression levels in human brain regions.

Transcriptomic studies of brain dysfunction usually compare expression profiles of brain regions between patients and unaffected individuals (Blalock *et al.*, 2004; Hodges *et al.*, 2006; Mirnics *et al.*, 2000) or model and control animals (Luthi-Carter *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2005). Alternatively, to get insight into the pathogenesis of disorders like Huntington and Parkinson diseases, which primarily affect specific populations of neurons, the genes preferentially expressed in these cells could be analyzed as a priority (Chung *et al.*, 2005; Desplats *et al.*, 2006). We therefore measured the expression levels of region-enriched transcripts in brain structures of R6/2 transgenic mice and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice, two widely used models of Huntington and Parkinson diseases, respectively.

The present study provides large-scale, knowledge-independent, quantitative gene expression data across a significant number of mouse brain regions. The expression level of any gene can be searched in this database, and accurately compared to that of other genes in the same brain region, or between different brain regions or tissues for which SAGE data are available. Here we illustrate the usefulness of this resource to find region-enriched transcripts of unknown function with possible relevance to human pathophysiology.

MATERIALS AND METHODS

Collection of brain samples from wild-type mice and mouse models. All experiments on mice were supervised by an investigator licensed by the Ministère de l'Agriculture, in conformity with French regulations. Mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (180 µg per gram of body weight) before decapitation. Samples for SAGE library construction and real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) were

collected from eight- to twelve-week-old wild-type male C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) essentially as described (de Chaldee *et al.*, 2006).

R6/2 transgenic mice express a human gene fragment containing the mutation responsible for Huntington disease. They develop a progressive neurological phenotype beginning at two months of age (Mangiarini *et al.*, 1996). The striatum and cortex were sampled from four 12-week-old R6/2 mice and four age-matched wild-type controls, before the onset of degeneration (Turmaine *et al.*, 2000).

Administration of the neurotoxin MPTP was used to model Parkinson disease (Sonsalla & Heikkila, 1986). Sixteen-week-old male C57BL/6 mice received four intraperitoneal injections of MPTP (20 mg/kg per injection) at two-hour intervals. Six MPTP-treated mice and five PBS-injected controls were sacrificed 24 hrs after the last injection, and six MPTP-treated mice and four PBS-injected controls were sacrificed seven days after the last injection. Each brain was divided into two parts. The right caudate-putamen was immediately processed for total RNA extraction, while the left caudate-putamen was stored until measurement of tyrosine hydroxylase immunoreactivity using a rabbit polyclonal antibody (Institut de Biotechnologies Jacques Boy, Reims, France) at a 1:10,000 dilution. Degeneration of the nigrostriatal pathway was indirectly estimated by the relative immunostaining intensity determined from the optical density in the caudate-putamen and the adjacent sensorimotor cortex, using a method adapted from Georgievska *et al.* (Georgievska *et al.*, 2002).

Construction of SAGE libraries. For each brain region, samples from three to 15 animals were pooled and Dounce-homogenized in Lysis/Binding Buffer from Dynabeads mRNA DIRECT kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). SAGE libraries were constructed according to a modified protocol adapted to small amounts of starting material (Virlon *et al.*, 1999). *Sau3A* I was used as the anchoring enzyme, and either *BsmF* I (for libraries from the somatosensory and entorhinal cortices, caudate-putamen, nucleus accumbens and thalamus)

or *Mme* I (for libraries from the whole brain, orbital, prelimbic, cingulate and motor cortices, substantia nigra and ventral tegmental area) served as the tagging enzyme. *BsmF* I produces 10-bp-long tags, whereas *Mme* I generates 15-bp-long tags. We used *Mme* I tags to facilitate the annotation process (Saha *et al.*, 2002). For comparisons between libraries, *Mme* I tags were converted to 10-bp-long tags.

Automated DNA sequencing was carried out on plasmid minipreparations either in our laboratory (for libraries from the somatosensory cortex, caudate-putamen, nucleus accumbens and thalamus) or at the Genoscope (Evry, France) (for all other libraries). Sequence analysis, tag extraction and counting were performed as described (Chabardes-Garonne *et al.*, 2003). All SAGE data reported in this paper have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database under accession nos. GSM183639, GSM183640, GSM183644-GSM183653.

Selection and annotation of region-enriched tags. In each library, tags occurring at a frequency greater than or equal to 5 in 80,000 and showing a seven-fold enrichment as compared to six other libraries were selected (*e.g.*, $n = 7$ versus $n = 0$ or 1; $n = 6$ or 5 versus $n = 0$; 80,000 tags per library). Monte-Carlo simulations indicate that the probability to observe such an enrichment by chance is still < 0.05 for low tag counts (Zhang *et al.*, 1997). For libraries constructed from cortical areas, this criterion was broadened to include tags showing a seven-fold enrichment as compared to five other libraries. This allowed to retain pancortical transcripts.

Each selected tag was manually annotated as previously described (de Chaldee, 2005). Only the most abundant tag from each transcript was used for inter-regional comparisons. The resulting list of transcripts was curated using data from the literature and qRT-PCR experiments. When the distribution of a transcript within the brain as reported in the literature or assessed by qRT-PCR was incompatible with the observed tag abundances, the annotation was considered improper and the tag was discarded from the list.

Functional classification of region-enriched transcripts. Functional classification was performed using Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) tools (Dennis *et al.*, 2003). The full list of region-enriched transcripts (308 genes) was analyzed, as well as sublists of transcripts enriched in gross anatomical divisions: the cerebral cortex, including all the cortical areas investigated (84 genes), the striatum (caudate-putamen and nucleus accumbens, 119 genes), the thalamus (65 genes) and the ventral midbrain (substantia nigra and ventral tegmental area, 70 genes). Over-representation of a functional class in a gene list as compared to the whole genome was assessed by the Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) score (Hosack *et al.*, 2003).

Real-time quantitative RT-PCR. Mouse brain samples were pooled between animals, with the exception of striata and cortices from R6/2 mice, MPTP-treated mice and corresponding controls, which were processed independently for each animal. Total RNAs were extracted using a guanidinium thiocyanate-based method. Human RNA samples were purchased from commercial sources (Ambion, Austin, TX; Clontech Laboratories, Mountain View, CA).

qRT-PCR was performed as previously described (de Chaldee *et al.*, 2006). The ubiquitously expressed peptidylprolyl isomerase A gene was used for normalization. All experiments were carried out on two replicates of each sample. Primer sequences are available from the authors upon request.

Combined in situ hybridization and immunofluorescence. *In situ* hybridization was performed as previously described (de Chaldee *et al.*, 2006), with the following modifications. cDNA fragments of *A930038C07Rik* (nucleotides 494-2313 of *AK029210*), *Slc10a4* (nucleotides 81-1506 of *AK087479*) and *Agpat4* (nucleotides 187-1347 of *AK005139*) were cloned into pCR4Blunt-TOPO or pCR2.1-TOPO vectors (Invitrogen). One microgram of each linearized plasmid served to perform *in vitro* transcription using T3

(antisense probes) or T7 (sense probes) RNA polymerase. Rabbit anti-tyrosine hydroxylase (Chemicon International, Temecula, CA) was added at a 1:1,000 dilution to the solution containing the alkaline phosphatase-conjugated Fab fragments. Before nitroblue tetrazolium chloride (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) staining, washed slides were incubated three hours at room temperature with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) diluted 1:1,000 in tris-buffered saline supplemented with 0.1 % tween-20, 0.5 % gelatin and 20 % normal goat serum, then washed extensively. Slides were coverslipped with FluorSave Reagent (Merck, Darmstadt, Germany) and examined using a Leica DMRXA fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Tyrosine hydroxylase-positive neurons were visualized under dark field with appropriate filter, while *in situ* hybridization-positive cells were visualized using bright-field illumination. Images were acquired with MetaMorph 4.6 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

RESULTS

Generation of a gene expression database from mouse brain regions. SAGE libraries were generated from the whole brain and 11 brain regions of the adult wild-type mouse (Fig. 1). At least 60,000 tags were sequenced from each library, yielding a total of 1,269,681 tags in the whole project with a median value of ~ 84,000 tags (Supplemental Table S1). In the present paper, all tag counts were normalized to a total number of 80,000 tags per library.

While the most abundant transcripts are sufficient to identify the brain tissue (de Chaldee *et al.*, 2003), a deeper analysis is required to detect differential transcripts. Tyrosine hydroxylase messenger, the most abundant region-enriched transcript, accounts for only 0.2 % of the total poly(A)⁺ RNA mass of the ventral tegmental area (tag count = 174 in 80,000).

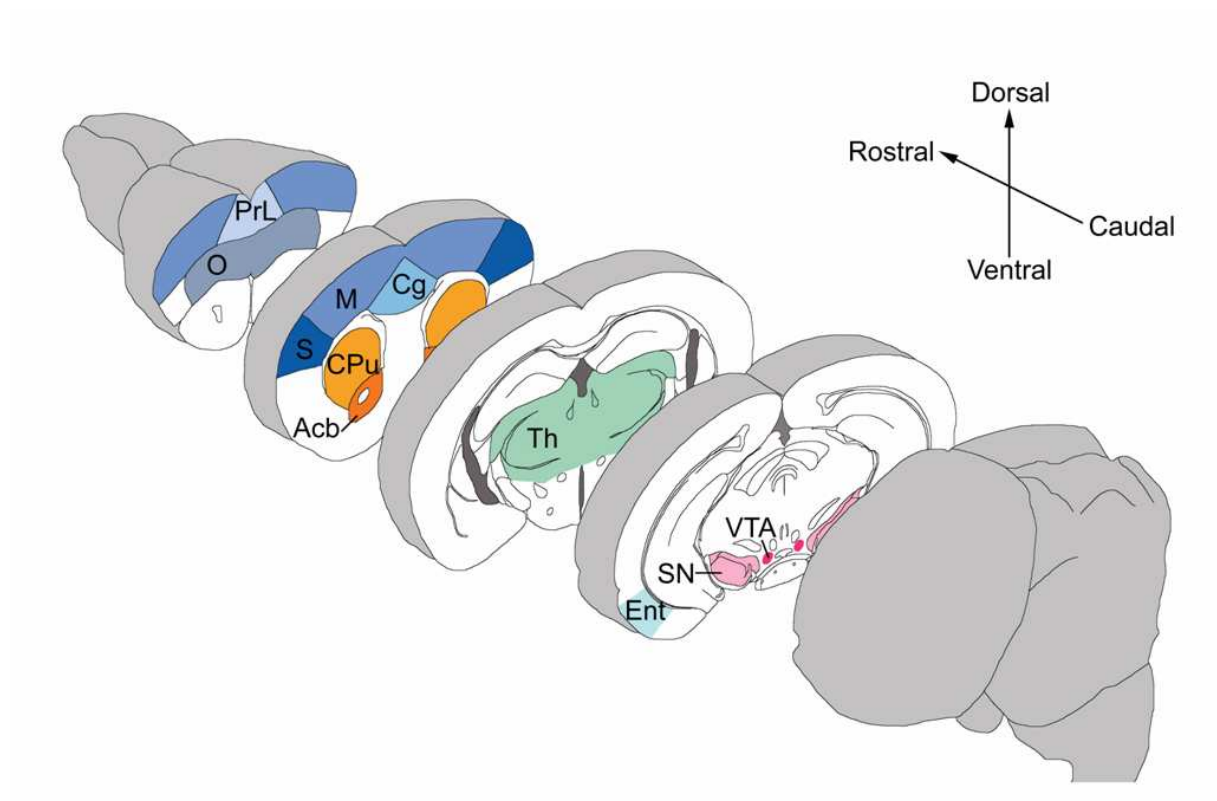


Fig. 1. Schematic view of the mouse brain regions dissected in the present study. Acb, nucleus accumbens; Cg, cingulate cortex; CPu, caudate-putamen; Ent, entorhinal cortex; M, motor cortex; O, orbital cortex; PrL, prelimbic cortex; S, somatosensory cortex; SN, substantia nigra; Th, thalamus; VTA, ventral tegmental area.

Identification of region-enriched transcripts. Tags enriched in brain regions were selected according to criteria calibrated on known regional markers (typically a seven-fold enrichment in one library as compared to six others). Three hundred and eight different tags meeting these criteria were annotated (Supplemental Table S2), a selection of which is displayed in Table 1. A wide range of expression levels was explored, down to transcripts representing only 0.006 % of the poly(A)⁺ RNA mass (tag count = 5 in 80,000), like RIKEN cDNA 2010001M06 gene transcript in the caudate-putamen. The list is punctuated by known regional markers [*e.g.*, tyrosine hydroxylase (Yamada *et al.*, 1992); dopamine receptor D1A (Monsma *et al.*, 1990)], but also contains genes with uncharacterized function, like most of those shown in Table 1, and even isolated expressed sequence tags (ESTs) (CK383136).

All region-enriched transcripts were functionally classified using Gene Ontology vocabulary (Ashburner *et al.*, 2000). For 20 % of them, the biological process and molecular function were either not mentioned or annotated only as unknown. Many genes involved in signal transduction were identified in all regions, while genes associated with locomotory behavior were significantly over-represented in the striatum (caudate-putamen and nucleus accumbens) and ventral midbrain (substantia nigra and ventral tegmental area), as compared to the whole genome (Supplemental Fig. S1). These structures are indeed known to be involved in the control of voluntary movement.

Distribution of region-enriched transcripts in mouse and human brains. For each differentially expressed transcript, the literature was carefully reviewed, and a reference confirming regional enrichment was provided whenever available (Supplemental Table S2). The expression level of a number of poorly documented genes was further explored in mouse brain regions using qRT-PCR (Supplemental Table S3). This analysis was extended to the hippocampus and the cerebellum. There was overall good agreement between SAGE and qRT-PCR data, demonstrating the reliability of the expression profiles presented here.

Table 1. Examples of brain region-enriched transcripts detected by SAGE

SAGE tag sequence	SAGE tag count												Gene symbol	Gene name
	Whole brain	Orbital cortex	Pre-limbic cortex	Cingulate cortex	Motor cortex	Somato-sensory cortex	Ento-rhinal cortex	Caudate putamen	Nucleus accumbens	Thalamus	Substantia nigra	Ventral tegmental area		
TGCAGCTGCG	1	8	0	3	3	2	1	2	2	0	1	0	<i>Dio2</i>	deiodinase, iodothyronine, type II
TCTTCTAAAG	1	0	8	5	2	0	1	0	0	0	1	0	<i>C1ql3</i>	C1q-like 3
TCAGTAACGG	2	0	7	1	1	1	0	0	1	0	0	1	<i>Ldb2</i>	LIM domain binding 2
ATGAAGATGC	2	1	4	7	6	0	2	1	0	0	0	0	<i>Dkk1</i>	dickkopf-like 1
ATGTAAGAAA	2	9	7	11	24	6	9	0	0	1	2	0	<i>3110035E14Rik</i>	RIKEN cDNA 3110035E14 gene
ACCACCTACC	2	4	1	3	1	8	0	0	0	5	1	2	<i>Cpne9</i>	copine family member IX
AAAGAAAACA	2	5	4	4	4	1	23	0	0	0	0	0	<i>Nov</i>	nephroblastoma overexpressed gene
CATAAACATC	0	3	2	4	2	0	7	0	0	0	0	0	<i>C630035N08Rik</i>	RIKEN cDNA C630035N08 gene
GCATGGTACA	1	3	2	5	3	16	4	38	16	7	2	2	<i>Sh2d5</i>	SH2 domain containing 5
AAGAACCTGG	5	0	0	0	0	2	0	26	4	0	1	1	<i>Tmem90a</i>	transmembrane protein 90a
CAAGCAATAA	2	0	0	0	0	0	0	11	4	0	1	0	<i>Gm705</i>	gene model 705, (NCBI)
AAGCTTGGCT	2	0	0	2	0	1	0	10	9	3	0	0	<i>BC072620</i>	cDNA sequence BC072620
ATGGAATTGG	1	1	1	0	1	4	0	9	3	3	2	1	<i>Gpr155</i>	G protein-coupled receptor 155
TGAGACTTTG	1	0	0	1	1	5	0	8	5	0	0	1	<i>Dclk3</i>	doublecortin-like kinase 3
CAACCCGTTA	0	0	0	0	0	0	1	7	4	0	0	0	<i>Drd1a</i>	dopamine receptor D1A
CTAACAACAC	1	0	0	1	0	0	0	7	1	4	0	0	<i>Nexn</i>	nexilin
CAGGGCTTAA	1	0	1	0	0	0	0	5	3	0	0	0	<i>2010001M06Rik</i>	RIKEN cDNA 2010001M06 gene
TTGGGAGACA	0	1	2	1	2	1	2	0	9	0	0	1		ESTs (<i>CK383136</i>)
AATATAAAAG	4	1	2	2	3	1	2	0	1	21	0	0	<i>Ptpn3</i>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3
CTGCCTTGTA	2	1	1	2	1	0	3	0	0	8	2	1	<i>Zdhhc22</i>	zinc finger, DHHC-type containing 22
TGGCCAATAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	1	<i>Vash2</i>	vasohibin 2
TGTCTCGGGA	2	0	1	1	1	0	0	0	1	7	4	0	<i>Dbn1d1</i>	dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing 1
ACTGGGAAAC	2	0	1	0	0	1	0	0	0	4	7	1	<i>Lrig1</i>	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1
GTATCACCCCT	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	7	3	<i>A930038C07Rik</i>	RIKEN cDNA A930038C07 gene
TTGTTCCATC	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	7	4	<i>Paqr6</i>	progesterin and adipoQ receptor family member VI
AAACCTACCA	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	28	174	<i>Th</i>	tyrosine hydroxylase
TAGTATCTAT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	13	<i>Slc10a4</i>	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 4
AACTAGCCAA	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	11	<i>Ebf3</i>	early B-cell factor 3
GCCACCACCG	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2	10	<i>Al646023</i>	expressed sequence Al646023
CCCATGGAGG	5	1	1	1	2	0	1	0	0	4	5	7	<i>Agpat4</i>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase, delta)

Tag counts were normalized to a total number of 80,000 tags in each SAGE library. Enrichment is indicated by bold numbers. Well-known regional markers are highlighted in gray. Acb, nucleus accumbens; Cg, cingulate cortex; CPu, caudate-putamen; Ent, entorhinal cortex; M, motor cortex; O, orbital cortex; PrL, pre-limbic cortex; S, somatosensory cortex; SN, substantia nigra; Th, thalamus; VTA, ventral tegmental area; WB, whole brain.

We investigated the expression of some region-enriched transcripts at higher resolution using *in situ* hybridization to mouse brain sections. Fig. 2 shows the uneven distribution of three mRNA species detected by digoxigenin-labeled riboprobes in the ventral midbrain. Co-detection of tyrosine hydroxylase, visualized by immunofluorescence, suggests that the cells expressing these transcripts are dopaminergic neurons of the substantia nigra, pars compacta, and the ventral tegmental area.

To address whether regional enrichment was conserved in man, we measured the expression level of 50 genes in a variety of human brain regions using qRT-PCR. For a number of genes, we observed excellent agreement between human and mouse expression profiles (compare Fig. 3 and Table 1). Overall, 30 transcripts were unevenly distributed in human brain, in a pattern consistent with mouse data (Fig. 3 and Supplemental Fig. S2).

Altered expression levels of region-enriched transcripts in mouse models of neurodegenerative disorders. Region-enriched transcripts might be selectively dysregulated in pathophysiological conditions affecting the structures where they are predominantly expressed. Huntington disease is characterized by a severe striatal atrophy due to the selective loss of medium spiny neurons. The cerebral cortex is also affected, though less dramatically (Harper, 1991). Using qRT-PCR, we therefore measured the expression levels of 24 transcripts enriched in the striatum (caudate-putamen and nucleus accumbens) and 15 cortex-enriched transcripts in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington disease (Mangiarini *et al.*, 1996). Three to four 12-week-old R6/2 mice were compared to the same number of age-matched wild-type controls. Among the 24 striatal transcripts quantified, 14 were significantly less abundant in R6/2 than in wild-type striata (Fig. 4). No significant difference was observed for the ten others, arguing against a general downregulation of striatal transcription. Five of the 15 cortical candidates tested exhibited a significantly lower expression level in

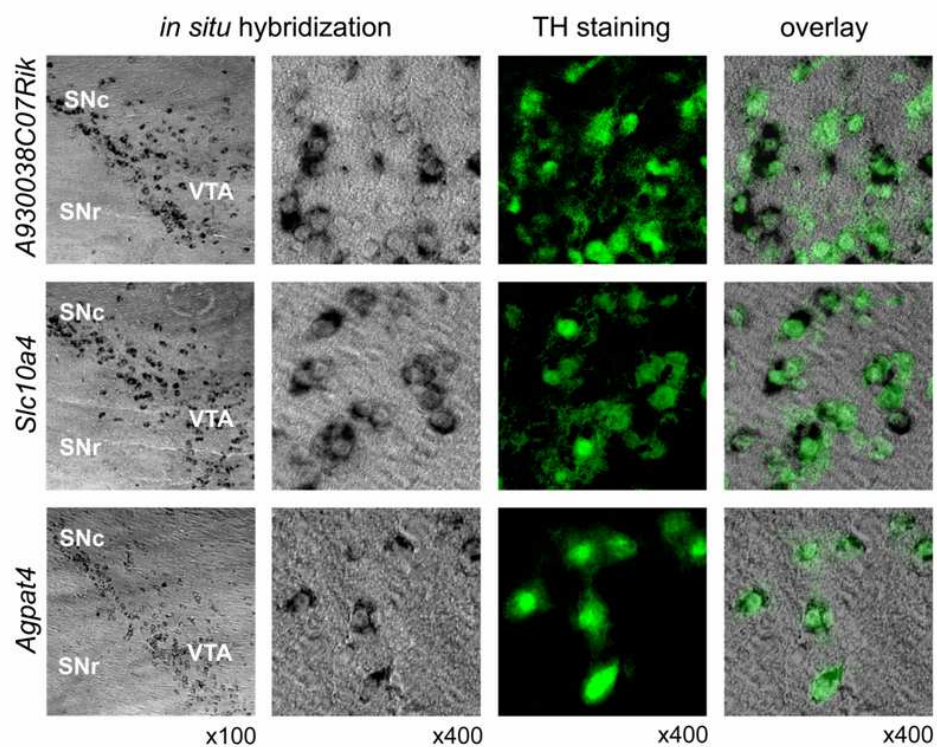


Fig. 2. Co-detection of tyrosine hydroxylase and mRNA species in mouse ventral midbrain. Tyrosine hydroxylase (TH) was visualized by immunofluorescence whereas mRNAs were evidenced by *in situ* hybridization using digoxigenin-labeled riboprobes. SNc, substantia nigra, pars compacta; SNr, substantia nigra, pars reticulata; VTA, ventral tegmental area.

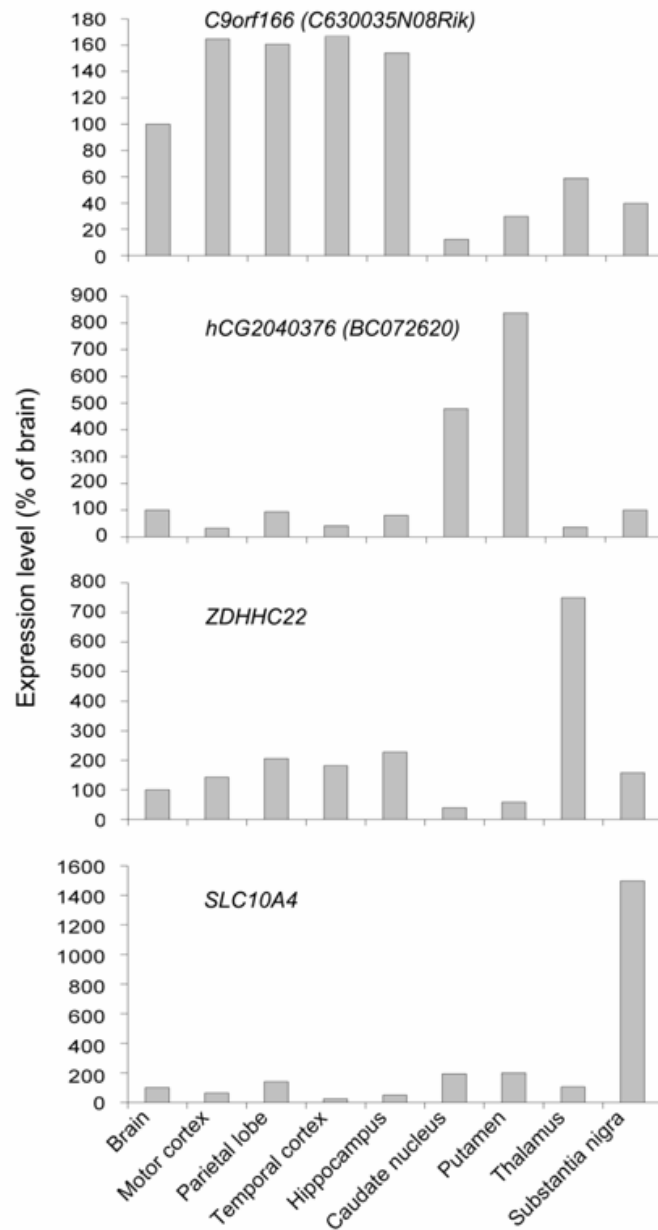


Fig. 3. Expression levels of region-enriched transcripts in human brain assessed by qRT-PCR. Mouse gene symbols are provided in parenthesis when different from their human orthologs. For each transcript, the expression level was set to 100 % in the whole brain. Note that the parietal lobe contains the somatosensory cortex, and the temporal cortex includes the entorhinal area.

R6/2 than in wild-type cortices (Fig. 4), indicating that transcriptional changes are not confined to the striatum.

Parkinson disease results from the selective degeneration of the dopaminergic neurons projecting from the substantia nigra to the caudate nucleus and putamen. This phenotype can be recapitulated in mice by MPTP intoxication (Sonsalla & Heikkila, 1986). In the present study, measurement of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the caudate-putamen indicated a severe decrease in dopamine synthesis 24 hrs after the last MPTP injection. Tyrosine hydroxylase depletion was still evident seven days after the last injection (Fig. 5A). Using qRT-PCR, we thus quantified 23 striatal transcripts in the caudate-putamen of MPTP-lesioned animals ($n = 6$) and PBS-injected controls at both time points. Three types of response to MPTP were observed (Fig. 5B): an early, transient downregulation (four genes); an early, transient upregulation (four genes); and a delayed upregulation (three genes). These results suggest that a number of transcriptional perturbations induced by MPTP in the striatum appear early after intoxication and are rapidly overcome, though delayed changes also occur.

DISCUSSION

The present SAGE resource provides an in-depth analysis of gene expression in mouse fore- and midbrain structures. From this dataset, we evidenced 308 transcripts that are preferentially expressed in discrete brain regions and, for ~ 50 of them, we present independent expression level measurements in mouse and human brain. This work offers a number of advantages over the existing literature and databases. In particular, SAGE tag counts provide a quantitative measure of expression level, allowing accurate comparisons both across brain regions and between transcripts. For instance, *in situ* hybridization signals for striatin and tescalcin mRNAs have comparable intensities in the caudate-putamen (Lein *et al.*, 2007), whereas SAGE data show that tescalcin messengers are five times more abundant.

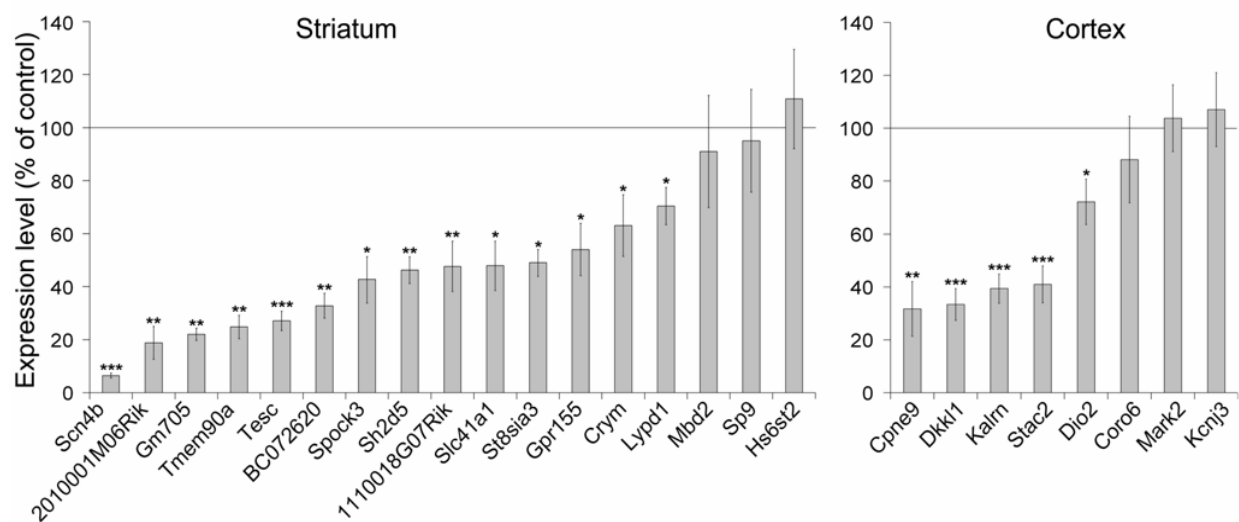


Fig. 4. qRT-PCR quantification of striatum- and cortex-enriched transcripts in striata and cortices of R6/2 mice. The expression level of each transcript is displayed as percent of the wild-type control value \pm standard error of the mean (SEM). Asterisks indicate significant differences assessed using Student's unpaired t test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Each column corresponds to the mean value obtained from four animals, except for *Tmem90a*, *BC072620*, *Spock3*, *Slc41a1*, *St8sia3* ($n = 3$ animals). The expression of ten striatum-enriched transcripts (*Tbl1x*, *Mctp1*, *Dcl3*, *Mgat5b*, *Hs6st2*, *Carhsp1*, *Mbd2*, *Nexn*, *Sp9*, *Wfs1*) and ten cortex-enriched transcripts (*Mark2*, *C1ql3*, *Ldb2*, *3110035E14Rik*, *Tmem178*, *Coro6*, *Kcnj3*, *Frmd6*, *Nov*, *C630035N08Rik*) was not significantly modified in the R6/2 model.

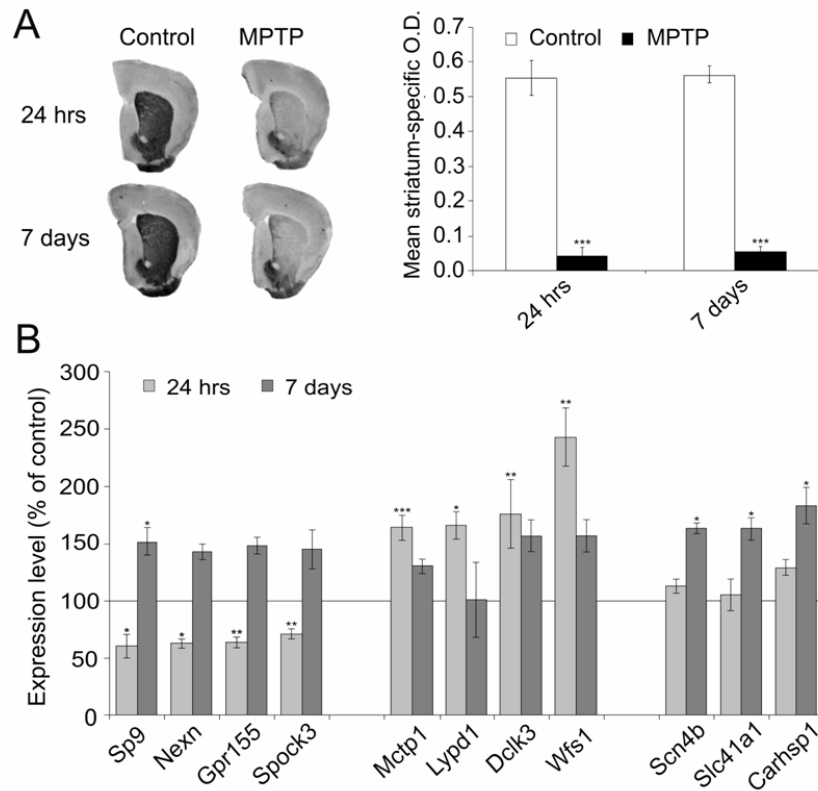


Fig. 5. Effects of MPTP intoxication on mouse striatum. *A*: Striatal tyrosine hydroxylase immunoreactivity. *Left*: Representative sections. *Right*: Specific optical density measurements were performed on 11 sections per animal and compared between MPTP-lesioned mice ($n_{24 \text{ hrs}} = 6$; $n_{7 \text{ days}} = 6$) and PBS-injected controls ($n_{24 \text{ hrs}} = 5$; $n_{7 \text{ days}} = 4$) using ANOVA ($***P < 0.001$). *B*: Striatum-enriched transcripts were quantified by qRT-PCR. The expression level of each transcript is displayed as percent of the corresponding PBS-injected control value \pm SEM. Asterisks indicate significant differences assessed using Student's unpaired *t* test: $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$. The following genes were not affected by MPTP treatment at any time point: *Sh2d5*, *Tesc*, *St8sia3*, *Tmem90a*, *Gm705*, *BC072620*, *Tbl1x*, *Mgat5b*, *Hs6st2*, *Mbd2*, *Crym*, *1110018G07Rik*.

This aspect is of particular interest when selecting promoters to direct efficient expression in specific brain regions. Furthermore, the regional specificity of any transcript can be easily checked from our data. As an example, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 5 (originally termed "striatal enriched phosphatase"), though considered as a marker of the caudate-putamen (Lombroso *et al.*, 1991), is also expressed at significant levels in frontal areas of the cerebral cortex (tag count = 51 in the caudate-putamen; 20 in the prelimbic cortex; 17 in the orbital, cingulate and motor cortices; 80,000 tags per library). It has not passed our criteria for regional enrichment. By contrast, adenosine A2a receptor transcript turned out to be enriched in the caudate-putamen. Its abundance is reputed to be low (Dixon *et al.*, 1998). Thus, extensive sequencing of SAGE libraries yielded high sensitivity.

The number of enriched transcripts varies from one brain region to another. They are especially numerous in the caudate-putamen and scarce in cortical areas, which may reflect greater cellular heterogeneity in the cortex (Sugino *et al.*, 2006). Furthermore, we observed partial overlap between related regions. In particular, both SAGE and qRT-PCR data suggest that several transcripts are pancortical (*e.g.*, RIKEN cDNA 3110035E14 gene transcript). However, we also identified transcripts enriched in restricted cortical territories, such as C1q-like 3 transcript in frontal areas and nephroblastoma overexpressed gene transcript in the entorhinal cortex. Moreover, within a given structure, enriched transcripts may be synthesized in distinct subregions. As an example, in the substantia nigra, we were able to record genes specifically expressed in the pars compacta, as demonstrated for RIKEN cDNA A930038C07 gene by *in situ* hybridization, as well as genes expressed in the pars reticulata, like protein inhibitor of activated STAT 4 (Galleguillos *et al.*, 2004).

Differentially expressed transcripts may be involved in pathophysiological mechanisms affecting specific brain structures. In the R6/2 mouse model of Huntington disease, about 60 % of the striatum-enriched transcripts that we analyzed were significantly

downregulated. For five of them (*Scn4b*, *Tesc*, *St8sia3*, *Tmem90a*, *Gm705*), we corroborate previous data obtained on striata of R6/2 (Luthi-Carter *et al.*, 2000) or R6/1 (Desplats *et al.*, 2006) mice. These five genes, as well as three others (*Spock3*, *Gpr155*, *Crym*), have recently been reported to be downregulated in the caudate nucleus of Huntington disease patients (Hodges *et al.*, 2006), thus confirming the reliability of the R6/2 model. Additionally, we show a significant downregulation for genes (SH2 domain containing 5; RIKEN cDNA 2010001M06 gene) whose expression has not been previously measured in mouse models or patients.

Our results support the hypothesis that striatum-specific functions are targeted in early stages of Huntington disease. Still, more than one third of the striatal candidates were unchanged, suggesting that particular transcription pathways are selectively affected. We also provide evidence for a modest number of alterations in the cortex of R6/2 mice, in agreement with the idea that the extent of transcriptional dysfunction parallels the extent of neurodegeneration (Hodges *et al.*, 2006). Interestingly, one of the transcripts downregulated in the cortex encodes kalirin, a specific interactor of huntingtin-associated protein 1 (HAP1) (Colomer *et al.*, 1997). HAP1 binds to huntingtin, the protein encoded by the gene mutated in Huntington disease (Li *et al.*, 1995).

In the MPTP model of Parkinson disease, a dozen of striatum-enriched transcripts were significantly dysregulated. Most changes were detected 24 hrs after the last injection and did not persist after seven days. Although using a different protocol of MPTP intoxication, Miller *et al.* have reported widespread transcriptional effects in the striatum of MPTP-treated mice, in particular seven days after the last injection (Miller *et al.*, 2005). Therefore, striatum-enriched transcripts do not seem to be over-represented in the whole set of transcripts that respond to MPTP in the striatum. However, five genes (*Scn4b*, *Spock3*, *Slc41a1*, *Gpr155*,

Lypd1) were also affected in the R6/2 model, indicating that common pathways may be mobilized in the striatum of both R6/2 and MPTP-intoxicated mice.

Many of the region-enriched transcripts provided here are poorly characterized, and 20 % were classified as functionally unknown. Since regional enrichment is conserved in man in a majority of cases, and because brain regions were partly selected on the basis of their involvement in human neuropsychiatric disorders, the present work provides a reservoir of candidates to investigate brain pathophysiology.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Jean-Christophe Aude and Arnaud Martel for informatics support, and Françoise Condé for help in dissection of brain regions.

GRANTS

C. Brochier was the recipient of a fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie. E. Diguët and E. Brouillet were supported by CNRS, CEA and High Q Foundation. The Genoscope received financial support from the Consortium National de Recherche en Génomique. We also received financial support from IMAGEN European integrated project.

REFERENCES

1. **Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G.** Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25: 25-29, 2000.
2. **Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW.** Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2173-2178, 2004.
3. **Boon WM, Beissbarth T, Hyde L, Smyth G, Gunnensen J, Denton DA, Scott H, Tan SS.** A comparative analysis of transcribed genes in the mouse hypothalamus and neocortex reveals chromosomal clustering. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14972-14977, 2004.
4. **Chabardes-Garonne D, Mejean A, Aude JC, Cheval L, Di Stefano A, Gaillard MC, Imbert-Teboul M, Wittner M, Balian C, Anthouard V, Robert C, Segurens B, Wincker P, Weissenbach J, Doucet A, Elalouf JM.** A panoramic view of gene expression in the human kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 13710-13715, 2003.
5. **Chin MH, Geng AB, Khan AH, Qian WJ, Petyuk VA, Boline J, Levy S, Toga AW, Smith RD, Leahy RM, Smith DJ.** A genome-scale map of expression for a mouse brain section obtained using voxelation. *Physiol Genomics* May 15, 2007; 10.1152/physiolgenomics.00287.2006.
6. **Chung CY, Seo H, Sonntag KC, Brooks A, Lin L, Isacson O.** Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. *Hum Mol Genet* 14: 1709-1725, 2005.
7. **Colomer V, Engelender S, Sharp AH, Duan K, Cooper JK, Lanahan A, Lyford G, Worley P, Ross CA.** Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) binds to a Trio-like

polypeptide, with a rac1 guanine nucleotide exchange factor domain. *Hum Mol Genet* 6: 1519-1525, 1997.

8. **de Chaldee M, Brochier C, Van de Vel A, Caudy N, Luthi-Carter R, Gaillard MC, Elalouf JM.** Capucin: a novel striatal marker down-regulated in rodent models of Huntington disease. *Genomics* 87: 200-207, 2006.
9. **de Chaldee M, Gaillard MC, Bizat N, Buhler JM, Manzoni O, Bockaert J, Hantraye P, Brouillet E, Elalouf JM.** Quantitative assessment of transcriptome differences between brain territories. *Genome Res* 13: 1646-1653, 2003.
10. **de Chaldee M, Gaillard M.C., Elalouf J.M.** Determining transcriptome differences between brain territories. In: *SAGE: current technologies and applications*, edited by Wang SM. Norfolk: Horizon Bioscience, 2005, p. 229-238.
11. **Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA.** DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4: P3, 2003.
12. **Desplats PA, Kass KE, Gilmartin T, Stanwood GD, Woodward EL, Head SR, Sutcliffe JG, Thomas EA.** Selective deficits in the expression of striatal-enriched mRNAs in Huntington's disease. *J Neurochem* 96: 743-757, 2006.
13. **Dixon AK, Richardson PJ, Lee K, Carter NP, Freeman TC.** Expression profiling of single cells using 3 prime end amplification (TPEA) PCR. *Nucleic Acids Res* 26: 4426-4431, 1998.
14. **Galleguillos D, Vecchiola A, Fuentealba JA, Ojeda V, Alvarez K, Gomez A, Andres ME.** PIASgamma represses the transcriptional activation induced by the nuclear receptor Nurr1. *J Biol Chem* 279: 2005-2011, 2004.
15. **Georgievska B, Kirik D, Bjorklund A.** Aberrant sprouting and downregulation of tyrosine hydroxylase in lesioned nigrostriatal dopamine neurons induced by long-lasting

overexpression of glial cell line derived neurotrophic factor in the striatum by lentiviral gene transfer. *Exp Neurol* 177: 461-474, 2002.

16. **Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ, Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, Heintz N.** A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425: 917-925, 2003.

17. **Harper P.** *Huntington's Disease*. London: W.B. Saunders, 1991.

18. **Hodges A, Strand AD, Aragaki AK, Kuhn A, Sengstag T, Hughes G, Elliston LA, Hartog C, Goldstein DR, Thu D, Hollingsworth ZR, Collin F, Synek B, Holmans PA, Young AB, Wexler NS, Delorenzi M, Kooperberg C, Augood SJ, Faull RL, Olson JM, Jones L, Luthi-Carter R.** Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum Mol Genet* 15: 965-977, 2006.

19. **Hosack DA, Dennis G, Jr., Sherman BT, Lane HC, Lempicki RA.** Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* 4: R70, 2003.

20. **Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramee AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM,**

- Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR.** Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445: 168-176, 2007.
21. **Li XJ, Li SH, Sharp AH, Nucifora FC, Jr., Schilling G, Lanahan A, Worley P, Snyder SH, Ross CA.** A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* 378: 398-402, 1995.
 22. **Lombroso PJ, Murdoch G, Lerner M.** Molecular characterization of a protein-tyrosine-phosphatase enriched in striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7242-7246, 1991.
 23. **Luthi-Carter R, Strand A, Peters NL, Solano SM, Hollingsworth ZR, Menon AS, Frey AS, Spektor BS, Penney EB, Schilling G, Ross CA, Borchelt DR, Tapscott SJ, Young AB, Cha JH, Olson JM.** Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 9: 1259-1271, 2000.
 24. **Magdaleno S, Jensen P, Brumwell CL, Seal A, Lehman K, Asbury A, Cheung T, Cornelius T, Batten DM, Eden C, Norland SM, Rice DS, Dosoooye N, Shakya S, Mehta P, Curran T.** BGEM: an *in situ* hybridization database of gene expression in the embryonic and adult mouse nervous system. *PLoS Biol* 4: e86, 2006.
 25. **Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trottier Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP.** Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87: 493-506, 1996.
 26. **Miller RM, Chen LL, Kiser GL, Giesler TL, Kaysser-Kranich TM, Palaniappan C, Federoff HJ.** Temporal evolution of mouse striatal gene expression following MPTP injury. *Neurobiol Aging* 26: 765-775, 2005.

27. **Mirnics K, Middleton FA, Marquez A, Lewis DA, Levitt P.** Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron* 28: 53-67, 2000.
28. **Monsma FJ, Jr., Mahan LC, McVittie LD, Gerfen CR, Sibley DR.** Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6723-6727, 1990.
29. **Saha S, Sparks AB, Rago C, Akmaev V, Wang CJ, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE.** Using the transcriptome to annotate the genome. *Nat Biotechnol* 20: 508-512, 2002.
30. **Sandberg R, Yasuda R, Pankratz DG, Carter TA, Del Rio JA, Wodicka L, Mayford M, Lockhart DJ, Barlow C.** Regional and strain-specific gene expression mapping in the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11038-11043, 2000.
31. **Siddiqui AS, Khattra J, Delaney AD, Zhao Y, Astell C, Asano J, Babakaiff R, Barber S, Beland J, Bohacec S, Brown-John M, Chand S, Charest D, Charters AM, Cullum R, Dhalla N, Featherstone R, Gerhard DS, Hoffman B, Holt RA, Hou J, Kuo BY, Lee LL, Lee S, Leung D, Ma K, Matsuo C, Mayo M, McDonald H, Prabhu AL, Pandoh P, Riggins GJ, de Algara TR, Rupert JL, Smailus D, Stott J, Tsai M, Varhol R, Vrljicak P, Wong D, Wu MK, Xie YY, Yang G, Zhang I, Hirst M, Jones SJ, Helgason CD, Simpson EM, Hoodless PA, Marra MA.** A mouse atlas of gene expression: large-scale digital gene-expression profiles from precisely defined developing C57BL/6J mouse tissues and cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18485-18490, 2005.
32. **Sonsalla PK, Heikkila RE.** The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *Eur J Pharmacol* 129: 339-345, 1986.
33. **Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB.** A gene atlas of the

mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6062-6067, 2004.

34. **Sugino K, Hempel CM, Miller MN, Hattox AM, Shapiro P, Wu C, Huang ZJ, Nelson SB.** Molecular taxonomy of major neuronal classes in the adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 9: 99-107, 2006.

35. **Turmaine M, Raza A, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP, Davies SW.** Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8093-8097, 2000.

36. **Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW.** Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487, 1995.

37. **Virlon B, Cheval L, Buhler JM, Billon E, Doucet A, Elalouf JM.** Serial microanalysis of renal transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15286-15291, 1999.

38. **Yamada K, Sakai M, Okamura H, Ibata Y, Nagatsu I.** Detection of tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine-N-methyltransferase messenger RNAs in the mouse adrenal gland and the brain by *in situ* hybridization. *Histochemistry* 97: 201-206, 1992.

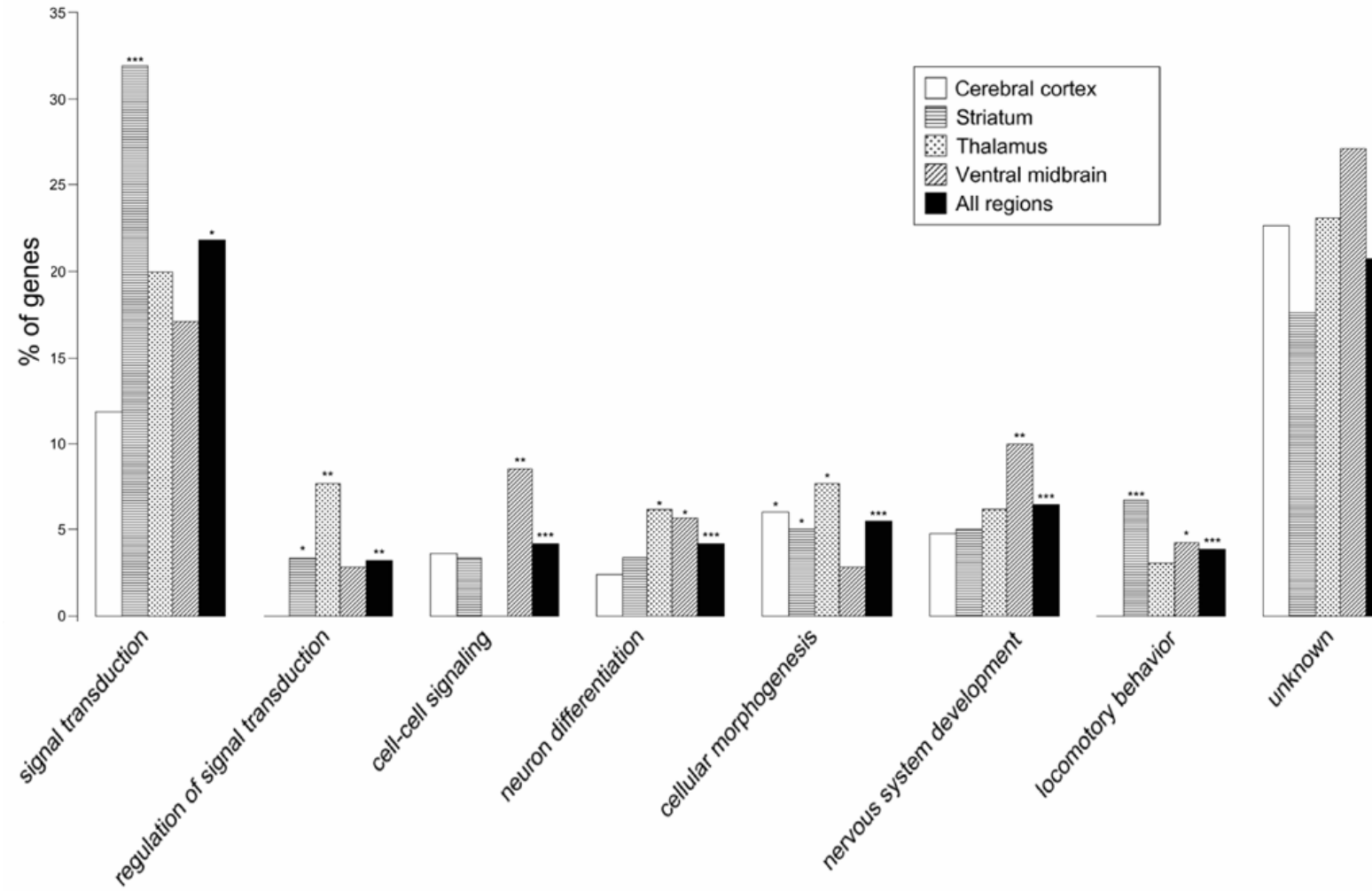
39. **Zapala MA, Hovatta I, Ellison JA, Wodicka L, Del Rio JA, Tennant R, Tynan W, Broide RS, Helton R, Stoveken BS, Winrow C, Lockhart DJ, Reilly JF, Young WG, Bloom FE, Lockhart DJ, Barlow C.** Adult mouse brain gene expression patterns bear an embryologic imprint. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10357-10362, 2005.

40. **Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW.** Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276: 1268-1272, 1997.

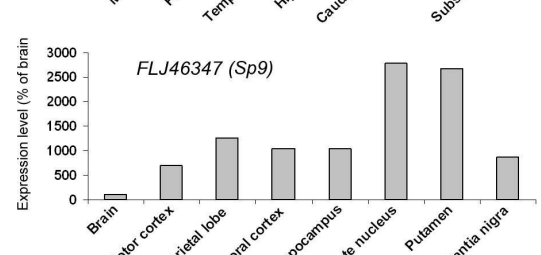
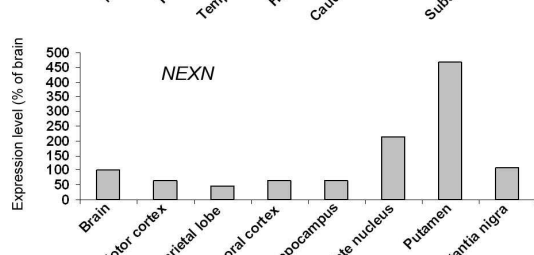
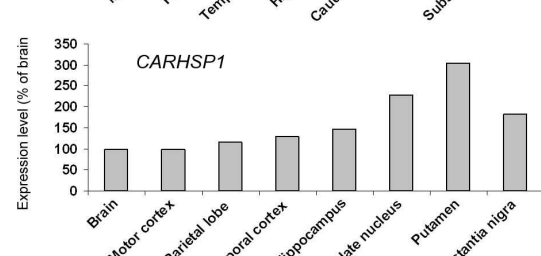
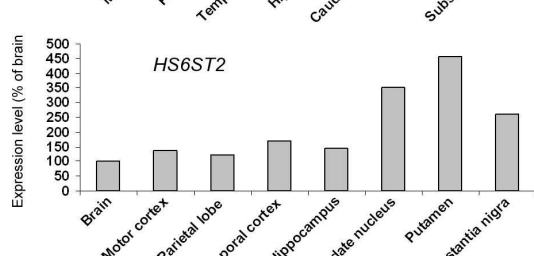
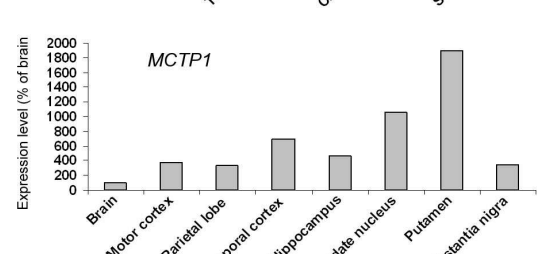
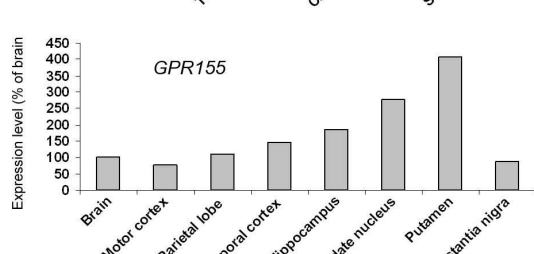
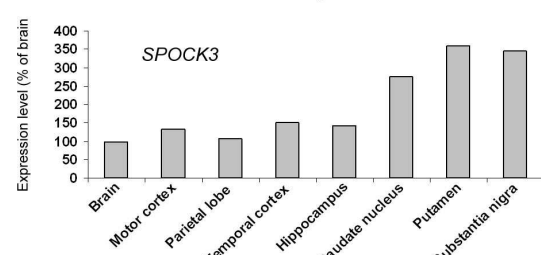
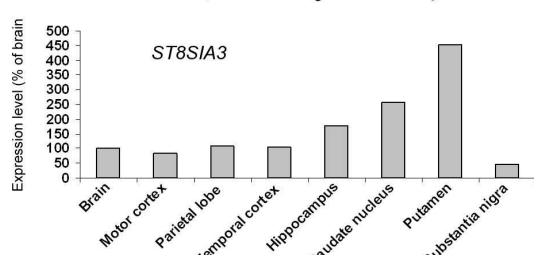
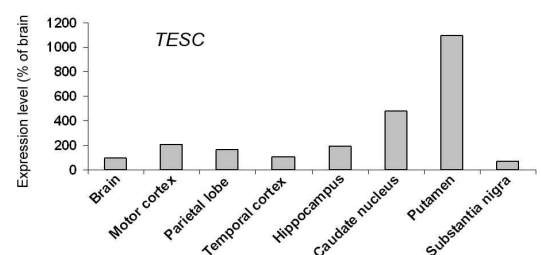
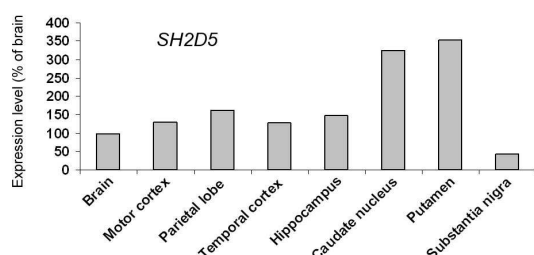
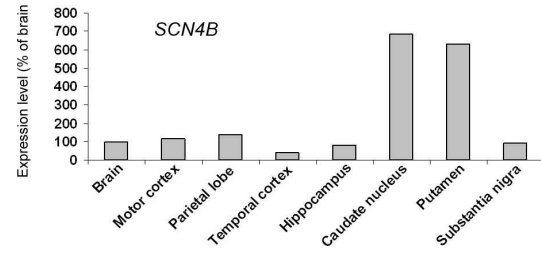
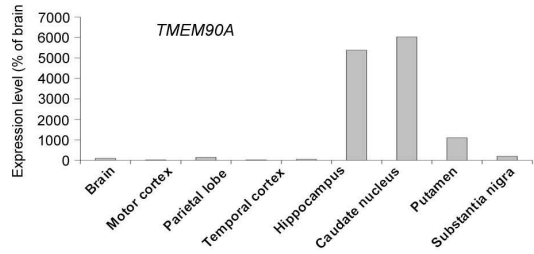
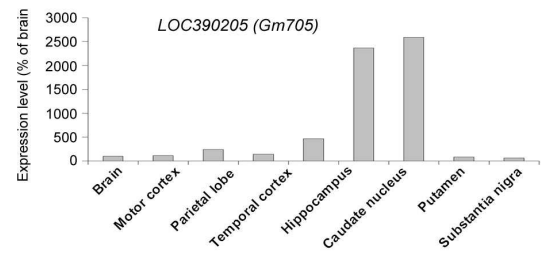
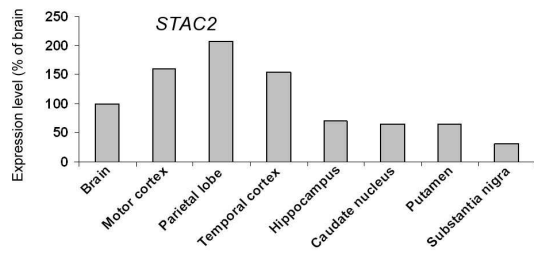
FIGURE LEGENDS

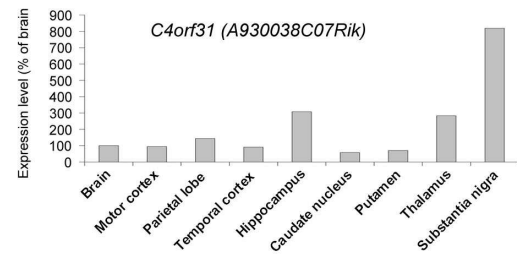
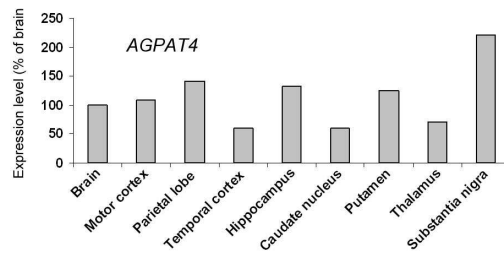
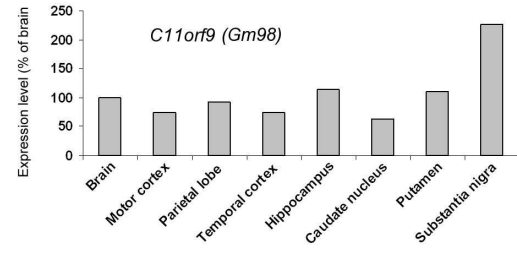
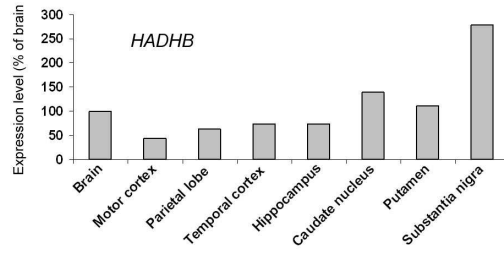
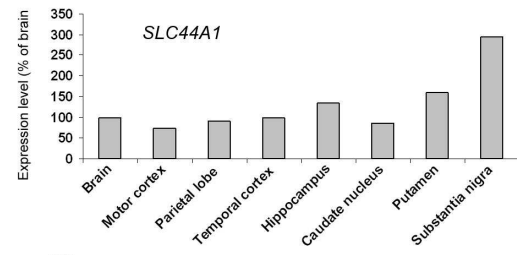
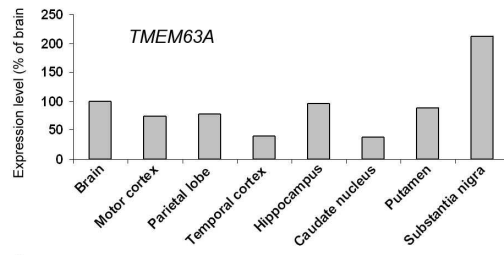
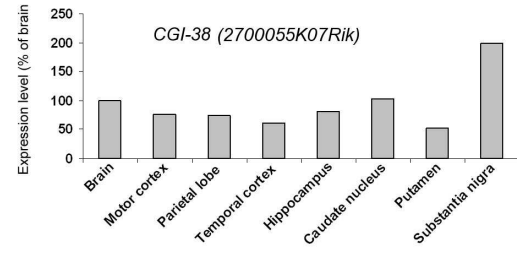
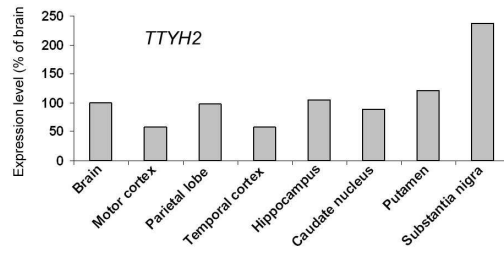
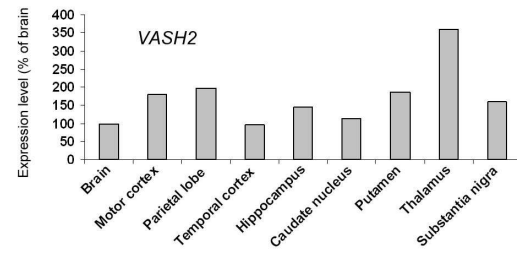
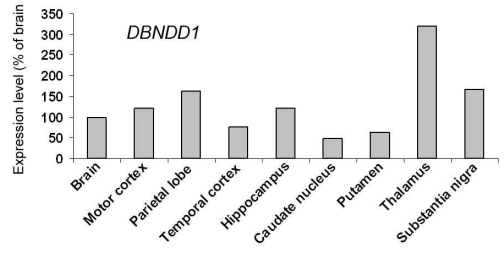
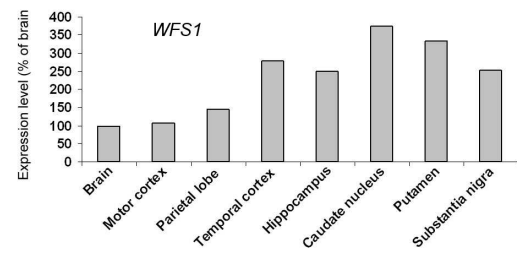
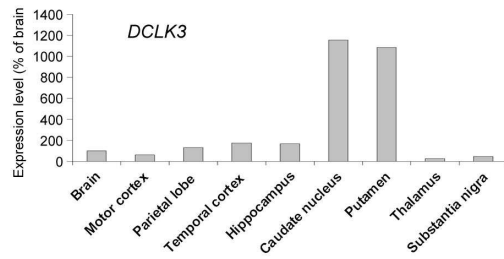
Supplemental Fig. S1. Example of functional categories found for mouse brain-region enriched transcripts. Five sets of genes were analyzed: those preferentially expressed in the cerebral cortex, in the caudate-putamen or nucleus accumbens ("striatum"), in the thalamus, in the substantia nigra or ventral tegmental area ("ventral midbrain"), and the full list of region-enriched transcripts ("all regions"). For each set, the columns represent the percentage of genes in each functional category. The unknown category corresponds to genes whose biological process and molecular function ontologies were either not mentioned or annotated only as unknown. Other categories were selected from third-level biological process Gene Ontology terms that were significantly over-represented in the full list as compared to the whole genome. Asterisks indicate significant over-representation as determined by the EASE score: * $P < 0.1$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Supplemental Fig. S2. Expression patterns of region-enriched transcripts in human brain assessed by qRT-PCR. Mouse gene symbols are provided in parenthesis when different from their human orthologs. Expression levels were set to 100 % in the whole brain. Thirty transcripts were enriched in the expected human brain region, of which 26 are shown here and four in Fig. 3. Major discrepancies between human and mouse expression profiles occurred for only seven genes: *C8orf46* (human ortholog of mouse *3110035E14Rik*); *TMEM178*; *CORO6*; *SLC41A1*; *KIAA0317* (human ortholog of mouse *1110018G07Rik*); *PEPD*; and *AMOTL1*.



Supplemental Fig. 1





Supplemental Fig.2

Table S1. Sequencing report of the SAGE libraries generated from wild-type adult mouse brain

Wild-type adult mouse brain region	Number of SAGE tags sequenced	Number of different SAGE tags detected
Whole brain	193,339	61,509
Orbital cortex	82,486	30,885
Prelimbic cortex	68,470	27,590
Cingulate cortex	158,937	54,338
Motor cortex	137,856	47,515
Somatosensory cortex	67,985	25,416
Entorhinal cortex	172,144	53,354
Caudate-putamen	73,657	25,114
Nucleus accumbens	89,577	29,279
Thalamus	61,332	24,402
Substantia nigra	77,651	30,394
Ventral tegmental area	86,247	32,397
Total	1,269,681	167,547*

*93,025 tags have been detected only once

Table S2. SAGE data for transcripts enriched in mouse brain regions.

Tag sequence	Tag count												Gene symbol	Gene name	Reference
	Br	O	PrL	Cg	M	S	Ent	CPu	Acb	Th	SN	VTA			
CGCAAGGTGC	6	14	8	7	4	1	0	4	1	0	5	2	<i>Mark2</i>	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2	PMID: 10491259
ATGAAGGCTC	3	9	4	2	6	4	1	1	0	0	3	1	<i>Herc3</i>	hect domain and RLD 3	PMID: 15465498
CAGTATATGC	2	9	2	1	2	1	3	1	5	4	1	1	<i>Impdh2</i>	inosine 5'-phosphate dehydrogenase 2	unpublished
CTGTCAGCCA	5	8	5	5	5	0	0	0	0	0	3	0	<i>Stac2</i>	SH3 and cysteine rich domain 2	unpublished
CTTCTGTATT	2	8	7	8	3	0	2	0	2	1	0	1	<i>Rasa11</i>	RAS protein activator like 1 (GAP1 like)	PMID: 17151600
TGCAGCTGCG	1	8	0	3	3	2	1	2	2	0	1	0	<i>Dio2</i>	deiodinase, iodothyronine, type II	unpublished
TCAAGAGAGT	5	7	4	2	3	4	1	0	1	1	0	0	<i>Arc</i>	activity regulated cytoskeletal-associated protein	PMID: 7857651
TCGGCTCCTG	1	7	0	2	2	2	0	2	4	4	0	0	<i>Rgs7bp</i>	regulator of G-protein signalling 7 binding protein	PMID: 15897264
TGTCAGTGGT	2	7	1	1	1	0	1	0	1	1	2	1	<i>Pde4d</i>	phosphodiesterase 4D, cAMP specific	PMID: 7650752
AGACTTGAGA	1	6	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	<i>Cecr6</i>	cat eye syndrome chromosome region, candidate 6 homolog (human)	unpublished
AGTTTGTGTT	0	5	0	1	1	0	1	0	0	0	2	0	<i>Arhgap29</i>	Rho GTPase activating protein 29	unpublished
CACACCTATC	1	5	2	3	3	0	0	0	0	0	0	1	<i>Asphd2</i>	aspartate beta-hydroxylase domain containing 2	unpublished
CGGACTCTGA	0	5	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	<i>Neurod2</i>	neurogenic differentiation 2	PMID: 8607837
CCCCTCGCCC	15	52	53	27	35	6	19	0	0	3	0	0	<i>Slc17a7</i>	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 7	PMID: 11502256
TAGGCATTTG	19	41	50	37	36	8	18	4	4	3	4	6	<i>Enc1</i>	ectodermal-neural cortex 1	PMID: 9566959
AACAAAATTC	25	16	46	18	24	1	4	3	3	1	18	17	<i>Bruno14</i>	bruno-like 4, RNA binding protein (Drosophila)	PMID: 12438720
AGCTTCTTTT	1	1	8	3	2	4	4	4	1	0	0	0	<i>Atrn11</i>	attractin like 1	PMID: 14531729
CATCCGTAAG	4	2	8	4	6	5	0	0	0	0	0	2	<i>Fhl2</i>	four and a half LIM domains 2	PMID: 17151600
GGTTCACAGC	1	1	8	3	4	5	1	1	3	0	0	2	<i>Kcnmb4</i>	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4	PMID: 10804197
TCTTCTAAAG	1	0	8	5	2	0	1	0	0	0	1	0	<i>Clql3</i>	Clq-like 3	unpublished
ATAGCCCTTC	2	0	7	2	2	2	2	0	1	0	0	0	<i>2310046A06Rik</i>	RIKEN cDNA 2310046A06 gene	PMID: 17151600
ATGCATTGTC	5	0	7	4	1	0	1	0	2	1	0	0	<i>Fos</i>	FBJ osteosarcoma oncogene	unpublished
CATGACTGTC	5	0	7	3	1	0	1	0	0	0	1	1	<i>Ttc7b</i>	tetratricopeptide repeat domain 7B	unpublished
CCCCCCTTTT	2	2	7	5	2	0	2	0	0	0	1	0	<i>Mezf2c</i>	myocyte enhancer factor 2C	PMID: 7679508
CCTTCCAGCT	4	3	7	5	3	0	0	0	0	3	0	8	<i>Psme3</i>	proteaseome (prosome, macropain) 28 subunit, 3	unpublished
CGCGGGGCTC	4	0	7	1	2	0	1	0	1	3	1	2	<i>Skiv21</i>	superkiller viralicidic activity 2-like (S. cerevisiae)	unpublished
GACTTTAAGA	2	3	7	2	2	1	0	0	1	1	4	6	<i>Bri3bp</i>	Bri3 binding protein	unpublished
TCAGTAACGG	2	0	7	1	1	1	0	0	1	0	0	1	<i>Ldb2</i>	LIM domain binding 2	unpublished
TGGCCAACGG	2	1	7	2	1	2	1	4	1	1	0	1	<i>Gars</i>	glycyl-tRNA synthetase	unpublished
TGTGTGGATG	5	1	7	4	4	5	3	0	4	1	1	0	<i>Herc1</i>	hect (homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus) domain and RCC1 (CHC1)-like domain (RLD) 1	unpublished
AGTCTGAGTG	2	0	6	1	0	1	0	0	0	0	0	1	<i>Prkcm</i>	protein kinase C, mu	unpublished
CAAATCCGCG	1	2	6	2	3	0	0	0	0	0	0	0	<i>Islr2</i>	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat 2	unpublished
CGCCTGCTCC	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>Slc27a4</i>	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4	PMID: 17151600
CATCCCCCAA	1	0	5	1	2	0	0	0	0	0	0	0	<i>Foxo6</i>	forkhead box O6	PMID: 12857750
TGCTCACGTT	2	1	5	2	5	2	0	0	0	0	0	0	<i>Neurod6</i>	neurogenic differentiation 6	PMID: 9454850
CCAGAGGGGC	1	6	6	10	3	4	6	1	1	1	0	0	<i>Synpo</i>	synaptopodin	PMID: 9314539
CTCTATTTTG	7	1	5	9	4	0	0	1	1	0	1	0	<i>Egr1</i>	early growth response 1	PMID: 8015720
ATGAAGATGC	2	1	4	7	6	0	2	1	0	0	0	0	<i>Dkk11</i>	dickkopf-like 1	PMID: 17151600
CAGGAAGTAC	6	5	2	7	1	2	3	1	0	1	0	1	<i>Parp6</i>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 6	unpublished
TGTCATTGTG	2	5	1	7	1	2	2	1	0	1	1	2	<i>Hivep1</i>	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein	PMID: 17151600
ATGTAAGAAA	2	9	7	11	24	6	9	0	0	1	2	0	<i>3110035E14Rik</i>	RIKEN cDNA 3110035E14 gene	PMID: 17151600
CTTAAAAGTT	7	8	6	4	19	6	3	1	0	1	0	0	<i>Kalrn</i>	kalirin, RhoGEF kinase	PMID: 9285789
CGTAAGGCTA	8	9	12	12	15	4	8	0	2	0	0	2	<i>Tmem178</i>	transmembrane protein 178	unpublished
CTGGGGATGC	2	0	2	6	10	1	2	0	1	1	7	1	<i>Coro6</i>	coronin, actin binding protein 6	unpublished
AGTAAAATGT	5	3	1	7	8	0	0	0	0	0	0	0	<i>Cacnb4</i>	calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit	PMID: 7609630

Tag sequence	Tag count												Gene symbol	Gene name	Reference
	Br	O	PrL	Cg	M	S	Ent	CPu	Acb	Th	SN	VTA			
ATCATTCGTG	3	3	2	5	8	1	1	3	1	0	1	6	<i>Polr2j</i>	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J	unpublished
TTGTTGTGCT	1	4	0	2	5	0	0	1	0	0	0	0	<i>Kcnv1</i>	potassium channel, subfamily V, 1	PMID: 8670833
ACGTCTTAGC	7	7	9	12	9	31	4	7	1	4	1	3	<i>Adcy1</i>	adenylate cyclase 1	PMID: 2001286
TTGTGACAGT	7	20	15	11	16	29	18	0	2	1	1	1	<i>Stx1a</i>	syntaxin 1A (brain)	PMID: 8361334
GCGGTATATA	2	6	4	2	5	26	7	0	0	3	0	0	<i>Rtn4r</i>	reticulon 4 receptor	PMID: 12378589
TGCAGAGACC	3	4	2	1	3	24	4	4	1	1	1	3	<i>Camk2n1</i>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	PMID: 11182241
TTTGCAAAGA	7	1	4	2	2	16	1	2	4	7	10	2	<i>Kcnc1</i>	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, men	PMID: 8120636
ACAGAGATAT	1	3	1	4	2	15	1	8	4	1	0	1	<i>4930505D03Rik</i>	RIKEN cDNA 4930505D03 gene	PMID: 17151600
TCTGAACCCC	3	8	5	7	2	15	1	1	1	12	1	4	<i>Apba2bp</i>	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 1 binding protein	PMID: 12840043
CGATGGGCCA	3	1	4	5	6	14	0	5	1	0	0	0	<i>Igfbbp6</i>	insulin-like growth factor binding protein 6	PMID: 10686339
TTCGGAACCA	4	8	2	8	4	14	14	5	1	1	1	0	<i>Fmn11</i>	Formin-like 1	PMID: 12840043
CACCAACATA	1	1	0	0	1	12	7	3	3	0	0	0	<i>6330527006Rik</i>	RIKEN cDNA 6330527006 gene	PMID: 17151600
GCATGAGCAG	1	0	1	4	1	11	0	9	7	1	2	8	<i>0610010K06Rik</i>	RIKEN cDNA 0610010K06 gene	unpublished
ACCACCTACC	2	4	1	3	1	8	0	0	0	5	1	2	<i>Cpne9</i>	copine family member IX	unpublished
ATTGTGTTTA	1	2	2	1	2	8	0	1	2	3	0	1	<i>Slc25a16</i>	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Graves disease autoantigen), member 16	PMID: 14651853
CAGTGCTCTG	4	3	0	1	1	8	3	0	1	7	0	1	<i>Bmp1</i>	bone morphogenetic protein 1	unpublished
CAGTCTGCCC	2	2	0	3	1	8	1	0	0	0	1	0	<i>Kcnj3</i>	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3	PMID: 7702616
AAATCACTGG	1	1	1	5	1	7	1	0	2	3	6	0	<i>1110012M11Rik</i>	RIKEN cDNA 1110012M11 gene	unpublished
AGGGAATTTA	1	2	1	2	3	7	2	7	0	0	1	0	<i>Homer1</i>	homer homolog 1 (Drosophila)	unpublished
ATCGTGTCCG	1	4	2	4	1	7	0	1	4	0	0	0	<i>Frmcd6</i>	FERM domain containing 6	unpublished
ATCTGTGTGG	2	1	0	1	2	7	1	1	7	5	3	1	<i>Fndc5</i>	fibronectin type III domain containing 5	unpublished
TGAAGTGACC	4	3	1	2	1	7	3	3	1	1	0	1	<i>1810026B05Rik</i>	RIKEN cDNA 1810026B05 gene	unpublished
AAGGGGTCCA	0	0	1	2	2	6	0	0	6	0	0	0	<i>5830415L20Rik</i>	RIKEN cDNA 5830415L20 gene	unpublished
ATTAGAATGT	2	3	0	1	0	5	0	0	0	5	0	1	<i>2700023E23Rik</i>	RIKEN cDNA 2700023E23 gene	unpublished
ACAAGGGGGT	5	4	4	8	6	25	28	0	4	17	0	0	<i>Nrn1</i>	neuritin 1	unpublished
AAAGAAAACA	2	5	4	4	4	1	23	0	0	0	0	0	<i>Nov</i>	nephroblastoma overexpressed gene	PMID: 16602821
AGAATTCCCA	2	3	5	5	1	0	14	3	0	7	1	0	<i>6330403A02Rik</i>	RIKEN cDNA 6330403A02 gene	PMID: 17151600
CCTTGTTCTT	1	0	1	2	2	2	11	4	3	0	0	0	<i>Bruno15</i>	bruno-like 5, RNA binding protein (Drosophila)	unpublished
TCTAAGCTGC	2	0	0	1	1	1	9	0	4	0	0	2	<i>Marcks11</i>	MARCKS-like 1	PMID: 1864362
AAATAAACCA	2	0	1	0	0	1	7	1	0	1	1	0	<i>Hpcal1</i>	hippocalcin-like 1	PMID: 16602821
CATAAACATC	0	3	2	4	2	0	7	0	0	0	0	0	<i>C630035N08Rik</i>	RIKEN cDNA C630035N08 gene	unpublished
CTTCTCTTTT	1	2	2	5	1	0	7	2	2	1	0	1	<i>Grin2b</i>	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B (epsilon 2)	unpublished
ACAGTCCTAG	34	21	12	17	39	75	19	194	71	151	20	11	<i>Pcp4</i>	Purkinje cell protein 4	PMID: 16457591
AATAAAGAAG	24	15	9	8	10	13	34	153	64	38	13	6	<i>Pde1b</i>	phosphodiesterase 1B, Ca2+-calmodulin dependent	PMID: 1332068
TGCTGAAAGA	16	6	2	1	1	4	7	122	81	1	0	6	<i>Penk1</i>	preproenkephalin 1	PMID: 6190182
GAATGCCATT	11	4	0	3	8	16	0	91	23	8	10	2	<i>Scn4b</i>	sodium channel, type IV, beta	PMID: 12840043
TCAGACCCAC	10	6	6	7	4	8	10	67	40	0	1	1	<i>Arpp21</i>	cyclic AMP-regulated phosphoprotein, 21	PMID: 1940913
CCAGTGGAGA	1	0	1	1	1	2	1	53	14	4	0	0	<i>Gpr88</i>	G-protein coupled receptor 88	PMID: 11056049
GCATGGTACA	1	3	2	5	3	16	4	38	16	7	2	2	<i>Sh2d5</i>	SH2 domain containing 5	PMID: 17151600
TCTCACAAAA	0	0	0	0	0	1	1	36	22	1	0	0	<i>Tac1</i>	tachykinin 1	PMID: 2477403
ATGTTACATA	4	2	0	2	3	2	1	35	7	1	1	2	<i>Rasd2</i>	RASD family, member 2	PMID: 8046460
TGGCAGGGCA	6	0	2	3	2	11	7	35	14	4	1	0	<i>Tesc</i>	tescalcin	PMID: 12840043
AAGACCATAG	3	2	4	1	1	4	1	28	6	3	0	3	<i>Adcy5</i>	adenylate cyclase 5	PMID: 8015383
AGAATCTTCA	1	0	0	1	1	7	0	28	4	0	0	0	<i>ST8sia3</i>	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 3	PMID: 12840043
TCCTCCTTCC	8	2	1	1	1	0	0	27	11	0	2	1	<i>Ppp1r1b</i>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B	PMID: 1533862
AAGAACCTGG	5	0	0	0	0	2	0	26	4	0	1	1	<i>Tmem90a</i>	transmembrane protein 90a	PMID: 16359841
TTGGAATCAT	5	0	1	1	3	4	1	24	4	3	4	6	<i>Spock3</i>	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan	PMID: 12840043
AAAAATGGAAA	2	0	0	1	0	2	1	22	10	0	0	0	<i>Rgs9</i>	regulator of G-protein signaling 9	PMID: 9556034

Tag sequence	Tag count												Gene symbol	Gene name	Reference
	Br	O	PrL	Cg	M	S	Ent	CPu	Acb	Th	SN	VTA			
AGGTGGTAGA	0	0	0	0	0	2	0	18	5	0	0	6	<i>Drd2</i>	dopamine receptor 2	PMID: 1833662
CGTGAAGAGG	1	1	1	1	0	0	1	17	4	4	1	1	<i>Rasgrp2</i>	RAS, guanyl releasing protein 2	PMID: 9789079
TCCGTGAATT	4	4	5	3	1	1	2	17	13	0	2	2	<i>Gng7</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 7 subunit	PMID: 7807587
CACGAGTTCA	1	2	5	3	0	2	5	16	4	3	0	1	<i>Rasgef1a</i>	RasGEF domain family, member 1A	unpublished
CTCAGTGGAT	2	0	1	1	1	1	2	16	6	0	3	1	<i>Pde10a</i>	phosphodiesterase 10A	PMID: 10583409
ATTAAATGTA	2	1	5	5	2	0	3	15	1	3	6	2	<i>AW049604</i>	expressed sequence AW049604	PMID: 15028294
AGGCGATGCT	3	3	1	5	3	2	2	14	1	4	1	1	<i>Socs5</i>	suppressor of cytokine signaling 5	unpublished
TATTGGTCGG	1	1	4	2	1	4	0	12	2	0	0	1	<i>Bcl11b</i>	B-cell leukemia/lymphoma 11B	PMID: 15465497
AAAGCCTACT	0	0	0	1	0	2	0	11	5	0	1	0	<i>Pde7b</i>	phosphodiesterase 7B	PMID: 11772393
CAAGCAATAA	2	0	0	0	0	0	0	11	4	0	1	0	<i>Gm705</i>	gene model 705, (NCBI)	PMID: 16405510
AAGCTTGGCT	2	0	0	2	0	1	0	10	9	3	0	0	<i>BC072620</i>	cDNA sequence BC072620	unpublished
ACAAGCTCAA	3	1	4	1	2	5	0	10	8	1	1	0	<i>Rab40b</i>	Rab40b, member RAS oncogene family	unpublished
ACCTGAACCT	0	2	0	1	0	0	0	10	6	0	0	0	<i>Rxrq</i>	retinoid X receptor gamma	PMID: 10051741
AGGCTGTCTG	1	1	0	1	1	2	1	10	2	1	2	1	<i>Slc41a1</i>	solute carrier family 41, member 1	PMID: 17151600
ATCCAAGCTG	0	0	0	0	0	0	0	10	8	0	3	1	<i>Pbx3</i>	pre B-cell leukemia transcription factor 3	PMID: 17151600
AAGCCACGCT	2	0	0	1	0	0	0	9	1	3	3	2	<i>Dock10</i>	dedicator of cytokinesis 10	unpublished
ACGGTCACTT	2	1	1	2	1	5	1	9	4	1	2	0	<i>Clqbp</i>	complement component 1, q subcomponent binding protein	unpublished
AGTGGCTAAA	2	0	1	1	2	5	2	9	3	0	0	1	<i>Ric8b</i>	resistance to inhibitors of cholinesterase 8 homolog B (C. elegans)	PMID: 15829631
ATATTCACTG	2	0	0	3	1	8	1	9	4	0	0	0	<i>Tb11x</i>	transducin (beta)-like 1 X-linked	unpublished
ATGGAATTGG	1	1	1	0	1	4	0	9	3	3	2	1	<i>Gpr155</i>	G protein-coupled receptor 155	PMID: 17151600
CAGTTTCTTA	4	2	0	0	0	1	1	9	6	0	0	2	<i>Unc13c</i>	unc-13 homolog C (C. elegans)	PMID: 11150314
CATGGTGAGG	2	2	0	1	2	2	0	9	4	0	0	1	<i>0610010D24Rik</i>	RIKEN cDNA 0610010D24 gene	PMID: 17151600
TGAGACTGTC	1	1	1	3	5	4	1	9	2	0	1	0	<i>Dgkb</i>	diacylglycerol kinase, beta	PMID: 7689223
TTCATCTTTG	2	0	0	1	1	5	0	9	3	1	2	1	<i>Hepacam</i>	hepatocyte cell adhesion molecule	unpublished
TTGGACTTTA	0	2	0	1	0	1	3	9	8	1	1	1	<i>Akap1</i>	A kinase (PRKA) anchor protein 1	unpublished
ACCTGACTCC	3	5	1	2	1	4	1	8	1	0	1	0	<i>Smpd3</i>	sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral	PMID: 17151600
ACTGAATAAT	1	0	1	0	0	0	3	8	3	0	0	0	<i>Grm5</i>	glutamate receptor, metabotropic 5	PMID: 1320017
ATGTAAGAAAT	1	0	1	2	1	1	0	8	1	3	0	2	<i>Neto2</i>	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	PMID: 16602821
ATTAGTTTGG	0	0	0	1	1	1	1	8	8	0	0	0	<i>Mctp1</i>	multiple C2 domains, transmembrane 1	unpublished
ATTTGGTTTA	1	0	0	0	1	1	0	8	4	1	0	0	<i>Ddx6</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6	unpublished
CTGGGAAGGA	0	1	0	1	1	4	1	8	1	0	1	0	<i>Zc3h11a</i>	zinc finger CCCH type containing 11A	unpublished
GGGAAGTACG	2	0	0	2	0	1	1	8	2	0	5	3	<i>Ass1</i>	argininosuccinate synthetase 1	PMID: 10407171
TGAGACTTTG	1	0	0	1	1	5	0	8	5	0	0	1	<i>Dclk3</i>	doublecortin-like kinase 3	PMID: 17151600
TGCCTGTCGG	0	0	1	1	0	6	1	8	6	3	0	0	<i>Mgat5b</i>	mannoside acetylglucosaminyltransferase 5, isoenzyme B	unpublished
AAAATCAAGA	3	3	1	2	2	0	0	7	4	1	1	0	<i>Tle4</i>	transducin-like enhancer of split 4, homolog of Drosophila E92A10.1	PMID: 16602821
ACAATAAAATA	0	3	0	1	0	2	3	7	2	0	0	3	<i>Usp45</i>	ubiquitin specific petidase 45	unpublished
ACGCCTGCA	1	1	1	3	2	0	2	7	4	0	1	5	<i>Upf1</i>	UPF1 regulator of nonsense transcripts homolog (yeast)	unpublished
ACGGAGCTGG	0	1	4	1	1	4	1	7	6	0	0	2	<i>Tmepai</i>	transmembrane, prostate androgen induced RNA	PMID: 17151600
ACGTAACCTA	1	1	1	3	1	5	2	7	4	3	1	0	<i>Rab35</i>	RAB35, member RAS oncogene family	unpublished
ACTATGGTAT	2	1	0	0	0	1	2	7	0	1	1	0	<i>Hs6st2</i>	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	unpublished
AGAACAGGGT	1	1	0	2	3	2	3	7	6	0	1	1	<i>Rhobtb2</i>	Rho-related BTB domain containing 2	unpublished
AGAGAGTGTC	0	0	0	3	0	0	1	7	4	3	1	1	<i>Carhsp1</i>	calcium regulated heat stable protein 1	unpublished
AGGAATGACA	0	0	0	1	0	0	0	7	4	0	0	0	<i>Dlx6</i>	distal-less homeobox 6	PMID: 14586460
AGGAGTACCA	2	0	0	2	1	1	3	7	1	1	2	1	<i>Mbd2</i>	methyl-CpG binding domain protein 2	unpublished
AGGCAGCAGG	0	0	4	1	2	2	1	7	3	1	0	2	<i>Psph</i>	phosphoserine phosphatase	unpublished
ATATGCCCCA	3	0	1	3	3	1	0	7	3	0	2	0	<i>Gm1313</i>	gene model 1313, (NCBI)	unpublished
ATCAGAATTA	1	2	0	1	2	1	0	7	1	7	0	1	<i>Epha4</i>	Eph receptor A4	PMID: 7609620
ATGCTTTATG	1	1	1	2	3	1	4	7	4	5	1	1	<i>EFcbp1</i>	EF hand calcium binding protein 1	unpublished

Tag sequence	Tag count													Gene symbol	Gene name	Reference
	Br	O	PrL	Cg	M	S	Ent	CPu	Acb	Th	SN	VTA				
CAACCCGTTA	0	0	0	0	0	0	1	7	4	0	0	0	Drd1a	dopamine receptor D1A	PMID: 2168556	
CAGTTCCTGA	1	3	0	1	2	0	0	7	3	0	0	0	Adra2c	adrenergic receptor, alpha 2c	PMID: 8843087	
CCAGGAGAGT	0	0	1	1	1	0	1	7	2	1	0	1	Strn	striatin, calmodulin binding protein	PMID: 8769426	
CTAACAACAC	1	0	0	1	0	0	0	7	1	4	0	0	Nexn	nexilin	unpublished	
GCATCATACT	1	0	0	1	2	1	0	7	0	0	0	0	9430020K01Rik	RIKEN cDNA 9430020K01 gene	PMID: 17151600	
GGGACAGCAT	1	5	1	5	1	0	0	7	1	1	4	3	C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	unpublished	
TCGAGGTCCA	0	0	0	0	0	0	0	7	2	1	0	0	Sp9	trans-acting transcription factor 9	unpublished	
TCGCTGCCTA	4	1	0	1	0	2	0	7	2	3	1	0	Pib5pa	phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate 5-phosphatase, A	unpublished	
TCTTTCCTTT	2	0	1	3	2	0	4	7	5	0	1	0	Sez6	seizure related gene 6	PMID: 9073173	
TTATGCCACT	2	0	1	2	2	2	1	7	4	1	1	0	Tceb1	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1	unpublished	
TTATGGTGGG	2	1	1	1	1	4	2	7	2	0	0	1	Plxna2	plexin A2	unpublished	
TTATGTTTTA	3	1	0	2	2	1	6	7	0	0	2	0	Reln	reelin	PMID: 17151600	
TTCAAATATT	1	1	0	3	0	0	1	7	3	0	0	0	Id4	inhibitor of DNA binding 4	PMID: 16443197	
TTTATGGTTA	2	1	0	2	1	4	0	7	2	1	0	1	Adam23	a disintegrin and metallopeptidase domain 23	PMID: 11242070	
TTTCTACTCG	2	2	0	2	1	0	0	7	2	0	0	0	Lrrk2	leucine-rich repeat kinase 2	PMID: 16504409	
ACTGTGGCGT	0	0	1	1	1	1	0	5	0	0	0	0	Papd4	PAP associated domain containing 4	unpublished	
AGGTGAAAAA	1	0	0	1	0	4	0	5	0	3	1	0		ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2 (brefeldin A-inhibited)	unpublished	
ATAGGTTTTT	0	0	1	0	2	1	0	5	0	1	0	0	Srd5a2l	steroid 5 alpha-reductase 2-like	unpublished	
ATTTGTGTAT	2	1	0	0	0	0	1	5	2	4	0	0	Ipo1l	importin 11	unpublished	
CAGGGCTTAA	1	0	1	0	0	0	0	5	3	0	0	0	2010001M06Rik	RIKEN cDNA 2010001M06 gene	unpublished	
CTGCTGTGAC	2	0	0	1	0	0	0	5	1	0	1	0	Adora2a	adenosine A2a receptor	PMID: 2168785	
GAAGACAAAA	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	Dach1	dachshund 1 (Drosophila)	PMID: 17151600	
GCTCATCCCA	0	0	0	0	0	0	1	5	4	1	1	1	Pik3c2a	phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, alpha f	unpublished	
TATCTCAAAG	2	0	0	1	0	0	0	5	1	0	1	1	Tgfa	transforming growth factor alpha	PMID: 2455024	
TTGCAACAAA	2	0	0	1	0	0	1	5	1	0	0	1	AA474455	expressed sequence AA474455	unpublished	
TTTTGAATGT	1	0	1	1	2	0	0	5	2	0	0	0	Pcgf5	polycomb group ring finger 5	unpublished	
TTACTAGTCT	10	5	19	16	3	4	22	26	45	0	0	1	Crym	crystallin, mu	PMID: 12840043	
CAAGCCAGCT	2	5	7	4	2	0	2	11	22	0	0	0	Col6a1	procollagen, type VI, alpha 1	PMID: 17151600	
TCTTCTGAGT	2	2	2	5	2	1	5	9	15	0	1	0	Wfs1	Wolfram syndrome 1 homolog (human)	PMID: 11181571	
TGATTGGGCA	0	0	0	0	0	2	3	0	13	0	0	0	Lypd1	Ly6/Plaur domain containing 1	unpublished	
TAAAGGTGAG	2	0	1	3	1	1	6	1	10	1	1	4	Wdr40b	WD repeat domain 40B	unpublished	
AAATACCTCA	2	0	1	2	1	0	0	3	9	0	2	3	Peg10	paternally expressed 10	unpublished	
ACGTGTACTA	2	0	0	1	1	1	2	5	9	1	4	2	Centb2	centaurin, beta 2	unpublished	
ATTTAGCCAC	2	0	0	3	1	0	1	7	9	0	3	1	1110018G07Rik	RIKEN cDNA 1110018G07 gene	PMID: 17151600	
TTGGGAGACA	0	1	2	1	2	1	2	0	9	0	0	1		ESTs (CK383136)	unpublished	
ATGTTTCATA	1	1	0	2	1	4	4	7	8	0	2	1	Ccdc91	coiled-coil domain containing 91	unpublished	
TTGAGCATGA	1	0	0	1	0	0	1	0	8	0	0	1	Nts	neurotensin	PMID: 15193419	
AAGGTCACAC	4	0	0	1	2	2	0	0	7	0	4	7	B630019K06Rik	RIKEN cDNA B630019K06 gene	unpublished	
GCTACATGGC	1	3	0	2	1	5	1	0	7	0	0	3	Ss1811	synovial sarcoma translocation gene on chromosome 18-like 1	unpublished	
TGCCCGGGTA	2	0	2	1	0	0	0	1	7	1	2	7	Baiap3	BAI1-associated protein 3	unpublished	
CAGCGTGCCT	1	0	0	0	0	0	0	4	6	0	0	0	Gpr6	G protein-coupled receptor 6	PMID: 8082799	
TTCCATGTCA	1	0	0	1	1	0	1	2	6	0	0	0	Setdb1	SET domain, bifurcated 1	unpublished	
TACAACCCAT	0	1	1	0	1	1	2	0	5	0	0	0	Jph4	junctophilin 4	PMID: 14559359	
TCCAGGGTGG	0	2	0	1	0	0	0	1	5	1	1	0	Mgat2	mannoside acetylglucosaminyltransferase 2	unpublished	
ACCAAGGAAT	2	0	0	2	0	1	1	0	0	48	2	0	Prkcd	protein kinase C, delta	PMID: 1477958	
CGGTAGCCTA	5	4	4	3	2	2	0	1	3	31	4	6	Plcbb4	phospholipase C, beta 4	PMID: 9753089	
AATATAAAAG	4	1	2	2	3	1	2	0	1	21	0	0	Ptpn3	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3	PMID: 7644504	
AACGCCTACA	3	2	1	2	2	2	3	3	1	18	1	4	Kndc1	kinase non-catalytic C-lobe domain (KIND) containing 1	unpublished	

Tag sequence	Tag count													Gene symbol	Gene name	Reference
	Br	O	PrL	Cg	M	S	Ent	CPu	Acb	Th	SN	VTA				
CTATAGACCT	7	1	0	1	1	0	3	9	0	16	5	0	<i>Rgs8</i>	regulator of G-protein signaling 8	PMID: 9315921	
TATGTTTCTT	1	2	1	1	1	1	7	11	2	16	0	1	<i>Shank3</i>	SH3/ankyrin domain gene 3	PMID: 15121189	
AGTAGCATT	1	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	<i>Tcf7l2</i>	transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box	PMID: 17151600	
TAGGCAGAAG	4	0	1	0	0	0	0	0	1	13	0	0	<i>Zic1</i>	zinc finger protein of the cerebellum 1	PMID: 7931345	
CTATTCTTAG	0	1	1	1	2	1	3	0	1	10	0	0	<i>Pepd</i>	peptidase D	unpublished	
GACAGGTGAC	1	2	0	0	1	4	4	9	3	10	0	0	<i>Tpd52l1</i>	tumor protein D52-like 1	PMID: 17151600	
TGCTTTCCT	2	1	0	1	1	5	1	2	4	10	0	1	<i>Bzw1</i>	basic leucine zipper and W2 domains 1	unpublished	
TGTCACGATT	0	0	0	2	1	0	0	1	0	10	0	0	<i>Ramp3</i>	receptor (calcitonin) activity modifying protein 3	PMID: 11532336	
AAAGGAAAAC	2	6	1	2	1	0	3	0	1	9	0	0	<i>Hnrpa3</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	unpublished	
ACTGTTTTTC	1	0	0	1	0	1	0	1	0	9	0	0	<i>Rgs16</i>	regulator of G-protein signaling 16	PMID: 11295237	
AGGCAGAATA	1	1	5	1	1	6	4	7	7	9	1	0	<i>Polr3h</i>	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide H	unpublished	
TATGTATCCT	1	0	0	1	1	0	3	1	0	9	0	1	<i>Ntnq1</i>	netrin G1	PMID: 10964959	
TCTGTGGGGT	1	0	1	1	1	2	3	7	4	9	1	2	<i>6430598A04Rik</i>	RIKEN cDNA 6430598A04 gene	unpublished	
AATGTGCTCT	0	0	0	0	1	0	0	0	0	8	0	0	<i>Tnnt1</i>	troponin T1, skeletal, slow	PMID: 17151600	
AGTCAGTGAC	2	0	0	2	1	1	2	0	2	8	2	0	<i>Mrpl50</i>	mitochondrial ribosomal protein L50	unpublished	
ATTTCTCCTG	2	3	1	1	3	4	1	0	1	8	0	2	<i>Adra1b</i>	adrenergic receptor, alpha 1b	PMID: 8278048	
CACCTGCTTA	2	1	1	1	1	4	5	0	4	8	1	1	<i>Ulk4</i>	unc-51-like kinase 4 (C. elegans)	unpublished	
CATCACAAGG	0	3	0	2	1	2	1	0	1	8	1	1	<i>Creg1</i>	cellular repressor of E1A-stimulated genes 1	PMID: 17151600	
CCAAGGGGCA	1	0	1	0	0	0	0	0	0	8	0	0	<i>Shox2</i>	short stature homeobox 2	PMID: 9371788	
CTGCCTTGTA	2	1	1	2	1	0	3	0	0	8	2	1	<i>Zdhhc22</i>	zinc finger, DHHC-type containing 22	PMID: 17151600	
CTGGCTGATG	3	2	0	2	1	1	3	1	1	8	1	1	<i>Itgb4bp</i>	integrin beta 4 binding protein	unpublished	
TCAGAGGGAA	0	2	0	0	2	1	2	1	4	8	2	0	<i>Tmem25</i>	transmembrane protein 25	unpublished	
TGAGGAGGAG	3	3	1	1	2	1	1	1	1	8	2	2	<i>Ctr9</i>	Ctr9, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (S.	unpublished	
TGGCCAATAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	1	<i>Vash2</i>	vasohibin 2	unpublished	
TGTACAGATG	2	2	1	0	0	0	0	0	1	8	1	5	<i>Amotl1</i>	angiomotin-like 1	PMID: 17151600	
TGTCCGCCTG	2	0	1	1	1	0	0	1	1	8	1	1	<i>Slc29a1</i>	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1	PMID: 15287894	
TTGAGTGCCA	2	2	4	1	4	0	1	7	0	8	1	1	<i>Lrrtm2</i>	leucine rich repeat transmembrane neuronal 2	PMID: 12676565	
AACAGCTCGC	0	2	0	1	1	4	2	4	3	7	1	0	<i>Trpc4ap</i>	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 associated protein	unpublished	
AAGAAGAGTC	1	0	1	2	1	0	1	0	1	7	3	2	<i>Tipin</i>	timeless interacting protein	PMID: 12875843	
AGATAAAATA	3	2	1	5	3	1	3	1	1	7	0	1	<i>Fbxo33</i>	F-box protein 33	unpublished	
AGCGTTTACA	1	1	1	0	1	4	2	5	4	7	0	2	<i>Cyld</i>	cyldromatosis (turban tumor syndrome)	unpublished	
ATAATTAGCT	0	0	0	0	0	0	0	3	2	7	0	0	<i>Cpox</i>	coproporphyrinogen oxidase	unpublished	
ATGACAAGAT	1	0	0	0	1	4	2	4	3	7	0	1	<i>Psmb2</i>	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 2	unpublished	
ATGTATAGAT	1	1	2	1	2	0	2	0	1	7	3	3	<i>Pex14</i>	peroxisomal biogenesis factor 14	unpublished	
CAAAGTGTTA	2	1	1	1	1	0	4	1	4	7	2	2	<i>Ubadc1</i>	ubiquitin associated domain containing 1	unpublished	
CCTGGTCTCT	2	2	1	2	1	1	1	0	1	7	1	5	<i>Yif1a</i>	Yip1 interacting factor homolog A (S. cerevisiae)	unpublished	
CGTAAAGAGG	0	4	5	0	4	1	2	1	2	7	0	1	<i>Mon1a</i>	MON1 homolog A (yeast)	unpublished	
TAAAAGACCT	2	0	0	3	3	0	1	0	0	7	3	0	<i>Fahd1</i>	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1	unpublished	
TACCCTGGGT	2	1	1	1	2	1	0	2	1	7	3	1	<i>Unkl</i>	unkempt-like (Drosophila)	unpublished	
TACCTCTCCA	2	1	0	2	1	1	1	0	0	7	3	3	<i>Tmem41a</i>	transmembrane protein 41a	PMID: 17151600	
TGATAAAATA	1	0	1	1	0	1	2	3	0	7	2	1	<i>Kpnb1</i>	karyopherin (importin) beta 1	unpublished	
TGGGAAAGCA	3	1	2	1	1	2	3	0	0	7	1	3	<i>Rgs3</i>	regulator of G-protein signaling 3	PMID: 9315921	
TGTCCATATT	2	1	2	3	2	0	1	0	1	7	0	0	<i>Lrrtm1</i>	leucine rich repeat transmembrane neuronal 1	PMID: 12676565	
TGTCTCGGGA	2	0	1	1	1	0	0	0	1	7	4	0	<i>Dyndd1</i>	dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing	PMID: 17151600	
TGTTGTGACA	0	2	1	1	2	2	0	0	2	7	0	1	<i>Stx12</i>	syntaxin 12	unpublished	
AAAGGACTCC	4	0	0	1	1	4	0	0	0	5	2	0	<i>Pvalb</i>	parvalbumin	PMID: 2744122	
AAATTCTGGG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	<i>Gm804</i>	gene model 804, (NCBI)	PMID: 17151600	
AGCAAAAAGT	0	0	0	1	1	0	0	1	0	5	0	0	<i>Lrrc7</i>	leucine rich repeat containing 7	unpublished	

Tag sequence	Tag count													Gene symbol	Gene name	Reference
	Br	O	PrL	Cg	M	S	Ent	CPu	AcB	Th	SN	VTA				
ATGTCTGCTT	0	3	0	1	0	0	1	1	4	5	0	0	Stxbp3a	syntaxin binding protein 3A	unpublished	
ATTGATGATA	2	0	0	0	1	0	0	0	0	5	4	2	Lhfp13	lipoma HMGIC fusion partner-like 3	unpublished	
CACCAGGATG	1	1	0	1	1	0	0	2	0	5	0	0	Cdc37l1	cell division cycle 37 homolog (S. cerevisiae)-like 1	unpublished	
CTCAGGGACC	1	0	0	1	1	0	1	0	0	5	1	0	1300010M03Rik	RIKEN cDNA 1300010M03 gene	unpublished	
GGTGTCTCTC	0	2	0	0	1	0	3	1	3	5	0	0	Mlx	MAX-like protein X	unpublished	
GTGGTTTTTG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	Slitrk6	SLIT and NTRK-like family, member 6	PMID: 14643680	
TCATTAATGC	4	0	0	3	2	0	0	0	0	5	5	0	Fnbp1	formin binding protein 1	unpublished	
TCACAGGCTG	38	11	12	5	5	9	7	14	53	53	105	38	Sparc	secreted acidic cysteine rich glycoprotein	PMID: 7968348	
CTGTTCCAAA	23	8	8	10	15	0	1	2	0	0	57	32	Plekhhb1	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins)	unpublished	
ATTTTATATA	20	5	6	10	5	1	1	5	4	12	43	27	Cldn11	claudin 11	unpublished	
CTGCTAGCGC	6	9	7	6	3	1	1	0	3	1	22	15	C030019F02Rik	RIKEN cDNA C030019F02 gene	unpublished	
AAATAAACAT	4	3	1	1	1	1	2	0	0	7	13	3	Aqp4	aquaporin 4	PMID: 10613514	
GAGAAAAGCC	2	0	0	1	1	1	0	0	1	3	10	2	G6pdx	glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked	unpublished	
CATGTTCCGC	3	2	0	1	1	0	0	0	0	1	9	9	Ttyh2	tweety homolog 2 (Drosophila)	unpublished	
GACGGATGCT	4	0	0	1	2	0	0	1	0	3	9	8	Ppp1r14a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A	unpublished	
TCAGTTCCTT	3	1	0	1	1	4	1	1	0	0	9	4	Psd2	pleckstrin and Sec7 domain containing 2	unpublished	
TGTGTGGGAC	4	2	1	2	3	0	0	0	0	1	9	2	Luzp1	leucine zipper protein 1	unpublished	
AATACAAATA	2	0	1	2	2	0	1	0	0	3	8	5	Gabrb1	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit beta 1	PMID: 15030384	
CAAAGTCTGA	2	0	0	1	2	0	0	1	0	3	8	4	Evi2a	ecotropic viral integration site 2a	unpublished	
CATGGATTAG	1	2	0	1	1	0	0	2	1	1	8	3	Tmem63a	transmembrane protein 63a	unpublished	
GACTTCCCAA	5	1	2	3	1	1	0	0	0	0	8	6	Tom1	target of myb1 homolog (chicken)	PMID: 10329004	
GAGGTTTGCG	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	8	0	Six3	sine oculis-related homeobox 3 homolog (Drosophila)	PMID: 15973738	
GGCTCCCTCG	2	0	4	3	4	1	0	1	1	0	8	3	Ivd	isovaleryl coenzyme A dehydrogenase	unpublished	
AAGAGAGAGA	1	3	5	3	5	1	0	3	1	0	7	0	E330009J07Rik	RIKEN cDNA E330009J07 gene	unpublished	
ACTGGGAAAC	2	0	1	0	0	1	0	0	0	4	7	1	Lriq1	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	unpublished	
AGCAGTCCGC	2	1	4	2	2	2	0	1	0	1	7	1	B130050I23Rik	RIKEN cDNA B130050I23 gene	unpublished	
AGGGCCGCAG	1	1	1	2	2	1	2	1	4	0	7	6	BC036313	cDNA sequence BC036313	unpublished	
ATGGCCTGCG	3	1	2	2	1	1	0	1	0	0	7	6	Shd	src homology 2 domain-containing transforming protein D	unpublished	
CTGAGTGAGT	2	1	5	2	1	1	1	2	0	1	7	2	Pias4	protein inhibitor of activated STAT 4	PMID: 14559918	
GTATCACCTT	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	7	3	A930038C07Rik	RIKEN cDNA A930038C07 gene	PMID: 17151600	
TCCCCACCAC	1	2	1	1	2	0	0	2	0	0	7	3	Mab21l1	mab-21-like 1 (C. elegans)	unpublished	
TTGTTCCATC	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	7	4	Paqr6	progesterone and adipoQ receptor family member VI	unpublished	
AAACCTACCA	2	0	0	1	0	0	0	0	1	0	28	174	Th	tyrosine hydroxylase	PMID: 1348741	
TGGTGCGTGT	10	16	23	26	8	6	11	9	24	16	9	131	Gap43	growth associated protein 43	PMID: 1672151	
TTGAATGTGC	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	73	121	Slc6a3	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopan	PMID: 1765147	
AGCAAAGGCA	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	16	76	Slc18a2	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2	PMID: 1438304	
CCTTTCTCCG	8	8	8	11	10	4	4	4	4	10	14	70	Resp18	regulated endocrine-specific protein 18	PMID: 9053801	
TAAGCAGCGT	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	20	54	Dlk1	delta-like 1 homolog (Drosophila)	PMID: 11742219	
ACCAATCAGA	4	0	0	1	1	0	0	0	1	1	20	44	Snca	synuclein, gamma	PMID: 9737786	
AAGAGAGCAA	4	2	0	0	1	5	0	3	1	7	18	31	Aldh1a1	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1	PMID: 11744377	
CTGTCTCTGG	13	1	2	4	1	1	2	2	4	7	18	30	Nr5n2	neurensin 2	unpublished	
AGTGACATGT	17	11	4	9	7	4	4	10	4	0	0	29	Calb1	calbindin-28K	PMID: 8176753	
AAAAGTTGAA	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	26	Ddc	dopa decarboxylase	PMID: 7904615	
TATTTAAGAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	26	Ret	ret proto-oncogen	PMID: 8657281	
TGCCTGCCGC	7	3	6	2	4	0	1	0	2	3	12	22	A230069A22Rik	RIKEN cDNA A230069A22 gene	unpublished	
CTACAATCTG	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	15	17	Agt	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member	PMID: 3710560	
TAGCTGTCTT	8	0	0	1	0	1	0	1	1	10	2	16	Calb2	calbindin 2	PMID: 2515762	
TGCCACCAAG	7	3	7	2	2	2	0	1	4	1	5	14	2700055K07Rik	RIKEN cDNA 2700055K07 gene	PMID: 17151600	

Tag sequence	Tag count												Gene symbol	Gene name	Reference
	Br	O	PrL	Cg	M	S	Ent	CPu	Acb	Th	SN	VTA			
TAGTATCTAT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	13	Slc10a4	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family 10)	PMID: 17151600
AGGTAGTAGA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	12	Chrna6	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 6	PMID: 8950106
AACTAGCCAA	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	11	Ebf3	early B-cell factor 3	PMID: 17151600
GCCACCACCG	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2	10	AI646023	expressed sequence AI646023	unpublished
TCTTCAGCAC	5	1	1	3	2	1	1	0	4	1	3	10	Hadhb	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit	unpublished
TTTGCTCAGC	4	1	1	2	2	0	0	1	2	0	3	10	Ache	acetylcholinesterase	PMID: 7971986
AGTAGACTGG	1	1	0	4	0	0	1	0	1	1	3	9	Ero1l	ERO1-like (S. cerevisiae)	unpublished
ATGGTGGTGG	2	0	6	2	1	0	1	1	6	0	0	9	Cdh13	cadherin 13	PMID: 17151600
GTGGCCTCGG	3	1	0	1	1	1	0	2	4	1	1	9	Gkap1	G kinase anchoring protein 1	unpublished
TTAGTTGTTT	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3	6	9	Chrna4	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4	PMID: 2754038
ACCCAAGAGG	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2	8	Ntsr1	neurotensin receptor 1	PMID: 1705671
CCTGGCTTTG	1	1	2	1	0	1	1	0	0	0	4	8	Nr4a2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	PMID: 8883941
TGGTGCCCTG	2	2	0	1	1	1	0	0	0	0	1	8	Csk	c-src tyrosine kinase	PMID: 17151600
TTTTGGAAct	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	8	Gch1	GTP cyclohydrolase 1	PMID: 8103077
ATAGCTTCCT	6	1	1	2	3	0	0	0	1	0	4	7	Slc44a1	Solute carrier family 44, member 1	unpublished
CAGTTTCTGA	3	5	1	6	5	0	1	0	2	1	1	7	N6amt2	N-6 adenine-specific DNA methyltransferase 2 (putative)	unpublished
CCCATGGAGG	5	1	1	1	2	0	1	0	0	4	5	7	Agpat4	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase, delta)	PMID: 17151600
CCTACCGCCA	3	2	4	3	2	0	1	0	0	0	0	7	BC010787	cDNA sequence BC010787	unpublished
CCTGCCCATG	3	0	0	1	1	0	0	0	4	0	3	7	Gm98	gene model 98, (NCBI)	unpublished
CTGTCAGGAG	7	2	2	2	1	1	0	0	0	0	4	7	2310022B05Rik	RIKEN cDNA 2310022B05 gene	unpublished
TACAGCCAGC	2	0	5	1	1	0	0	0	1	0	3	7	As3mt	arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase	unpublished
TGCTGTCGTC	2	1	1	3	1	0	0	0	0	0	1	7	Kcnk9	potassium channel, subfamily K, member 9	PMID: 11567039
TGGGTACACC	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	7	Ntn1	netrin 1	PMID: 9143559

Table S3. Expression levels of region-enriched transcripts in wild-type mouse brain assessed by real-time quantitative RT-PCR

Gene symbol	Gene name	Expression level (%)													
		WB	O	PrL	Cq	M	S	Ent	Cpu	Acb	Th	SN	VTA	Hip	Cb
<i>Mark2</i>	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2	47	100	43	61	83	43	*	13	*	15	58	*	43	31
<i>Stac2</i>	SH3 and cysteine rich domain 2	35	100	67	*	137	108	*	9	*	10	46	*	16	7
<i>Dio2</i>	deiodinase, iodothyronine, type II	43	100	32	*	64	49	*	64	*	23	13	*	34	13
<i>Clql3</i>	Clq-like 3	18	66	100	*	28	21	*	1	3	6	*	*	25	4
<i>Ldb2</i>	LIM domain binding 2	31	*	100	95	41	20	*	9	*	11	18	*	31	9
<i>Dkk1l</i>	dickkopf-like 1	53	91	*	100	98	100	*	0	2	1	2	*	5	1
<i>3110035E14Rik</i>	RIKEN cDNA 3110035E14 gene	55	*	*	98	100	85	*	9	18	3	4	*	40	2
<i>Tmem178</i>	transmembrane protein 178	44	*	*	164	100	157	*	9	8	3	15	*	115	103
<i>Coro6</i>	coronin, actin binding protein 6	24	*	39	*	100	76	*	13	31	*	93	*	9	31
<i>6330527006Rik</i>	RIKEN cDNA 6330527006 gene	40	110	41	69	89	100	44	44	39	1	0	*	19	20
<i>Cpne9</i>	copine family member IX	37	*	46	38	51	100	*	15	*	*	2	*	6	36
<i>Frm36</i>	FERM domain containing 6	26	*	31	81	67	100	*	17	*	59	24	*	16	16
<i>Nov</i>	nephroblastoma overexpressed gene	17	*	*	*	19	12	100	0	2	1	1	*	39	1
<i>6330403A02Rik</i>	RIKEN cDNA 6330403A02 gene	22	*	68	*	40	17	100	38	*	41	2	*	88	4
<i>C630035N08Rik</i>	RIKEN cDNA C630035N08 gene	42	*	57	*	41	44	100	25	*	6	9	*	55	9
<i>Sh2d5</i>	SH2 domain containing 5	15	*	34	*	17	17	*	100	94	17	9	*	9	4
<i>Gm705</i>	gene model 705, (NCBI)	4	*	*	2	1	1	*	100	36	1	2	*	7	0
<i>BC072620</i>	cDNA sequence BC072620	13	*	10	*	10	13	*	100	54	2	3	*	12	16
<i>Slc41a1</i>	solute carrier family 41, member 1	28	*	*	31	24	24	*	100	54	30	100	*	33	42
<i>Tb11x</i>	transducin (beta)-like 1 X-linked	39	*	44	*	35	43	*	100	74	29	27	*	6	45
<i>Gpr155</i>	G protein-coupled receptor 155	13	*	17	*	13	16	*	100	29	12	22	*	16	8
<i>Mctp1</i>	multiple C2 domains, transmembrane 1	21	*	*	20	15	12	*	100	130	4	10	*	21	36
<i>Dclk3</i>	doublecortin-like kinase 3	13	*	*	67	25	27	*	100	157	8	13	*	8	4
<i>Mgat5b</i>	mannoside acetylglucosaminyltransferase 5, isoenzyme B	22	*	*	38	27	29	*	100	47	29	29	*		
														21	18
<i>Hs6st2</i>	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	45	*	*	37	24	21	*	100	88	37	56	*	20	32
<i>Carhsp1</i>	calcium regulated heat stable protein 1	28	*	*	23	18	16	*	100	125	36	93	*	28	41
<i>Nexn</i>	nexilin	8	*	*	*	3	4	2	100	44	25	5	*	0	6
<i>Sp9</i>	trans-acting transcription factor 9	25	*	*	14	12	9	*	100	105	7	44	*	13	3
<i>2010001M06Rik</i>	RIKEN cDNA 2010001M06 gene	15	*	13	*	10	9	*	100	24	7	*	*	5	11
<i>Lypd1</i>	Ly6/Plaur domain containing 1	41	*	*	*	15	*	*	37	100	9	17	*	52	8
<i>1110018G07Rik</i>	RIKEN cDNA 1110018G07 gene	21	*	37	*	25	33	*	114	100	18	23	*	24	13
	ESTs (CK383136)	17	*	*	*	35	34	43	56	100	8	12	*	33	6

Gene symbol	Gene name	Expression level (%)													
		WB	O	PrL	Cg	M	S	Ent	Cpu	Acb	Th	SN	VTA	Hip	Cb
<i>Pepd</i>	peptidase D	42	*	39	*	32	42	*	57	33	100	55	*	23	35
<i>Zdhhc22</i>	zinc finger, DHHC-type containing 22	17	*	45	*	21	13	*	5	8	100	*	*	3	10
<i>Vash2</i>	vasohibin 2	28	*	*	21	12	11	*	12	12	100	17	*	5	6
<i>Amotl1</i>	angiomotin-like 1	15	*	*	13	6	6	*	19	41	100	44	*	7	22
	dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain	35	*	*	26	25	19	*	29	37	100	38	*	26	15
<i>Dbnddl</i>	containing 1														
<i>Ppp1r14a</i>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A	38	*	*	15	18	*	*	39	*	48	100	*	*	*
<i>Psd2</i>	pleckstrin and Sec7 domain containing 2	31	*	*	20	24	*	*	15	*	31	100	*	*	*
<i>Tmem63a</i>	transmembrane protein 63a	41	*	*	27	22	*	*	29	*	40	100	*	*	*
	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains														
<i>Lrig1</i>	1	19	*	*	7	5	6	*	12	15	21	100	*	8	47
<i>A930038C07Rik</i>	RIKEN cDNA A930038C07 gene	47	*	*	28	14	*	*	28	*	14	100	*	*	*
<i>Pagr6</i>	progesterone and adipoQ receptor family member VI	15	*	*	4	2	*	*	4	*	13	100	32	7	57
<i>A230069A22Rik</i>	RIKEN cDNA A230069A22 gene	29	*	*	15	13	*	*	23	*	25	*	100	*	*
<i>2700055K07Rik</i>	RIKEN cDNA 2700055K07 gene	35	*	*	*	14	*	*	27	23	34	75	100	22	*
<i>Slc10a4</i>	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 4	2	*	*	0	0	*	*	11	*	2	31	100	0	2
<i>Ebf3</i>	early B-cell factor 3	6	*	*	1	0	*	*	1	*	8	*	100	*	*
<i>AI646023</i>	expressed sequence AI646023	17	*	*	7	5	*	*	6	*	11	*	100	*	*
<i>Agpat4</i>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase, delta)	23	20	33	*	21	9	*	13	*	21	37	100	37	10
<i>Gm98</i>	gene model 98, (NCBI)	25	*	*	16	23	*	*	39	*	53	*	100	*	*
<i>2310022B05Rik</i>	RIKEN cDNA 2310022B05 gene	26	*	*	*	13	*	*	13	87	39	435	100	96	*
<i>As3mt</i>	arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase	13	*	*	*	10	*	*	16	*	19	*	100	*	*

IV RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

IV.1 Hybridation *in situ* non-isotopique de marqueurs régionaux sur le cerveau de souris

Pour huit ARNm présentant un enrichissement régionalisé, nous avons complété l'étude de leur expression par une analyse en hybridation *in situ* (HIS) à l'aide de sondes marquées à la digoxigénine. Pour l'ensemble de ces marqueurs, les données d'HIS concordent avec les résultats de SAGE et de la RT-PCR quantitative.

L'hybridation des ARNm de *Mark2*, *Dio2* et *Ldb2* marque le cortex préfrontal selon un gradient d'expression manifesté par un marquage des couches profondes du cortex qui perd en intensité dans les couches superficielles (*cf.* figure 25). Pour les trois transcrits, le marquage est fort dans le cortex orbitaire. *Mark2* est également exprimé dans le noyau olfactif et le cortex piriforme, et *Ldb2* dans la couche granulaire du bulbe olfactif. L'hybridation *in situ* de *3110035E14Rik* révèle également un gradient de son expression depuis les couches corticales VIb et VIa, intensément marquées, vers la couche V (figure 26). Le noyau olfactif est également fortement marqué.

L'expression striatale de *Gm705* et *Sh2d5* est confirmée par l'HIS (*cf.* figure 27). L'ARNm de *Gm705* est abondant dans la partie dorsolatérale du striatum, et l'intensité diminue graduellement vers la partie ventrale. *Gm705* est également détecté dans les tubercules olfactifs, le septum et le cortex pédonculaire dorsal. *Sh2d5* est exprimé dans le striatum et le globus pallidus latéral. L'hybridation *in situ* révèle également la présence de l'ARNm dans les cortex cingulaire et piriforme.

Pep4 et *Dbndd1* sont exprimés dans le thalamus (*cf.* figure 28). L'expression de *Pep4* semble généralisée à tous les noyaux, et est aussi mise en évidence dans le gyrus denté de l'hippocampe. En revanche, l'ARNm de *Dbndd1* est réparti de façon discrète, puisqu'il est détecté dans le noyau thalamique ventropostérieur et l'habenula, mais absent du groupe nucléaire thalamique postérieur.

Enfin, l'hybridation *in situ* d'*Agpat4* révèle un marquage très spécifique de la substance noire compacte et de l'aire tegmentale ventrale (*cf.* figure 29).

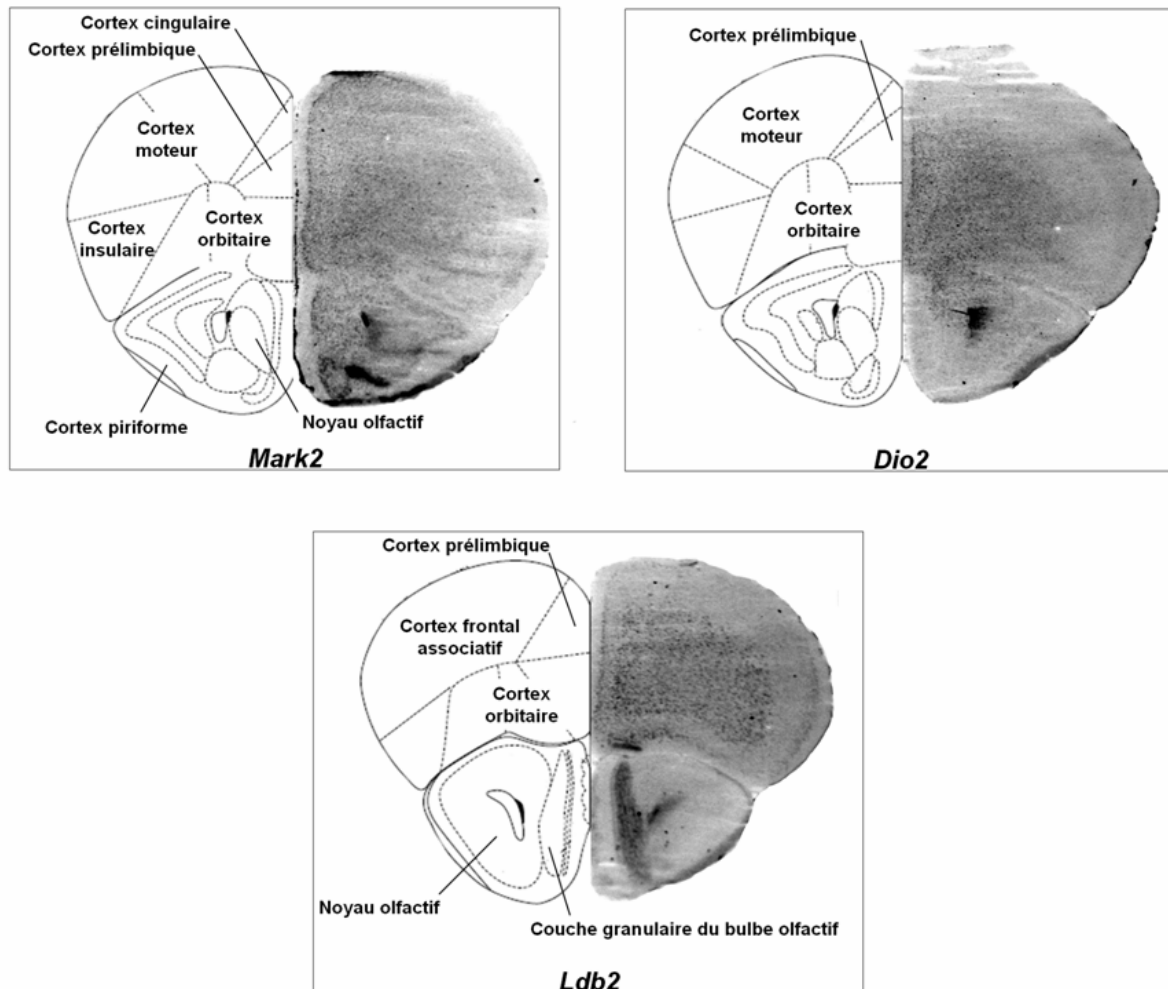


Figure 25. Visualisation des ARNm de trois marqueurs du cortex préfrontal par hybridation *in situ*. Les patterns d'expression de *Dio2*, *Mark2* et *Ldb2* ont été étudiés respectivement sur des coupes coronales de 2.2, 2.3 et 2.5 mm antérieurement au bregma. Les représentations schématiques en vis-à-vis des coupes sont adaptées de l'atlas de Paxinos et Franklin, 2001.

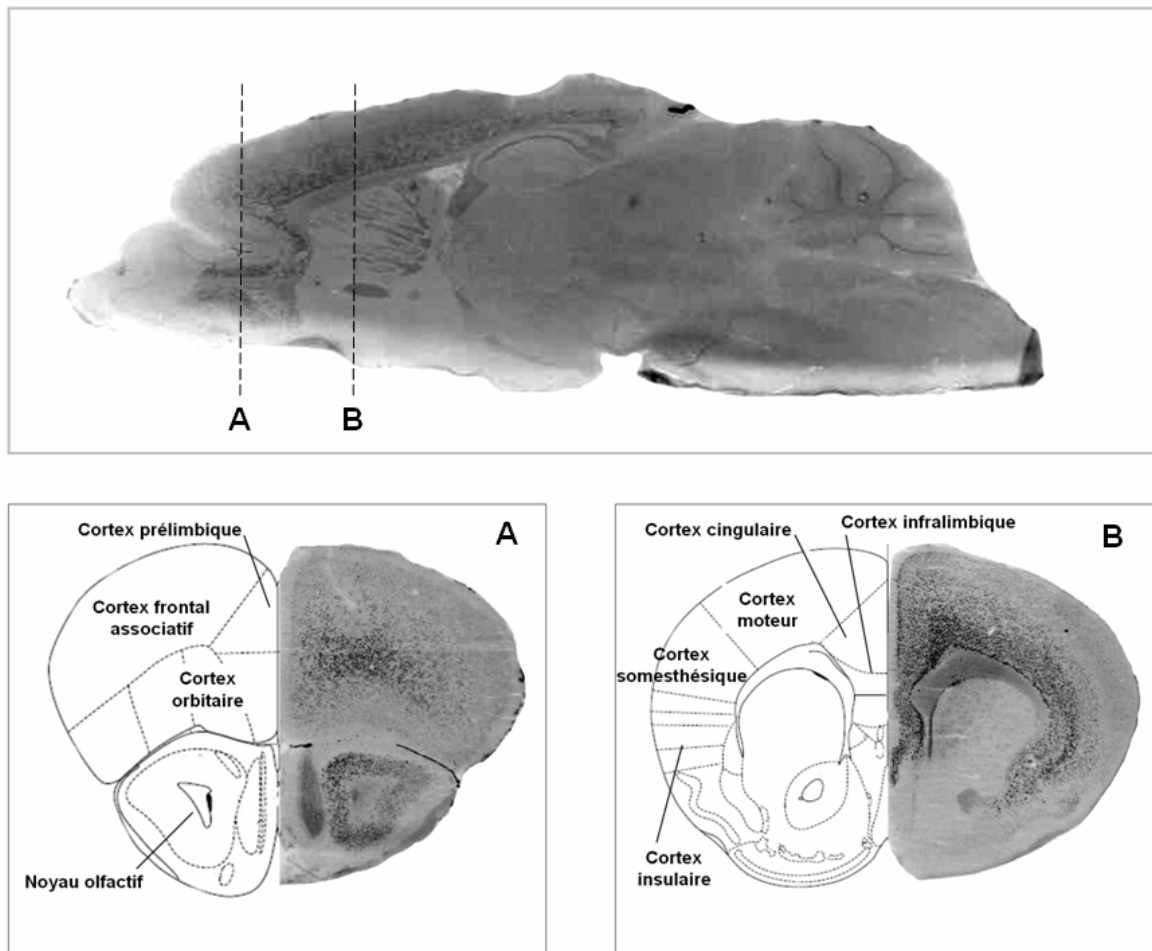


Figure 26. Visualisation de l'ARNm de *3110035E14Rik* par hybridation *in situ*. Sur la partie supérieure de la figure : coupe sagittale (1.2 mm en latéral). Les lignes pointillées indiquent les positions des coupes A et B (respectivement positionnées à 2.6 et 1.3 mm antérieurement au bregma). Les représentations schématiques en vis-à-vis des coupes sont adaptées de l'atlas de Paxinos et Franklin, 2001.

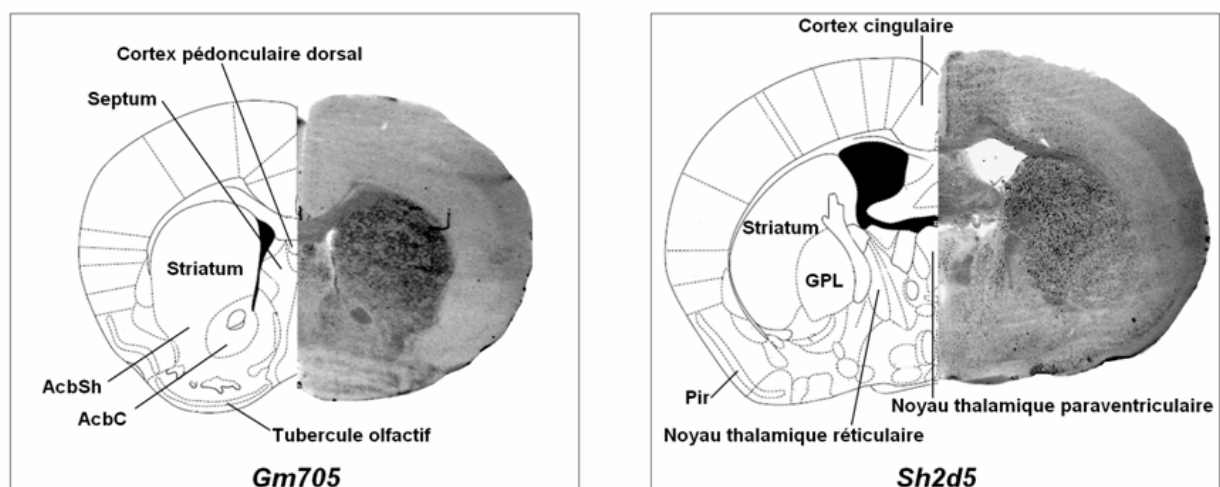


Figure 27. Visualisation de deux ARNm enrichis dans le striatum par hybridation *in situ*. Les patterns d'expression de *Gm705* et *Sh2d5* ont été étudiés respectivement sur des coupes coronales de 1.1 mm antérieurement et 0.3 mm postérieurement au bregma. AcbC : *core* du noyau accumbens ; AcbSh : *shell* du noyau accumbens ; GPL : globus pallidus latéral ; Pir : cortex piriforme. Les représentations schématiques en vis-à-vis des coupes sont adaptées de l'atlas de Paxinos et Franklin, 2001.

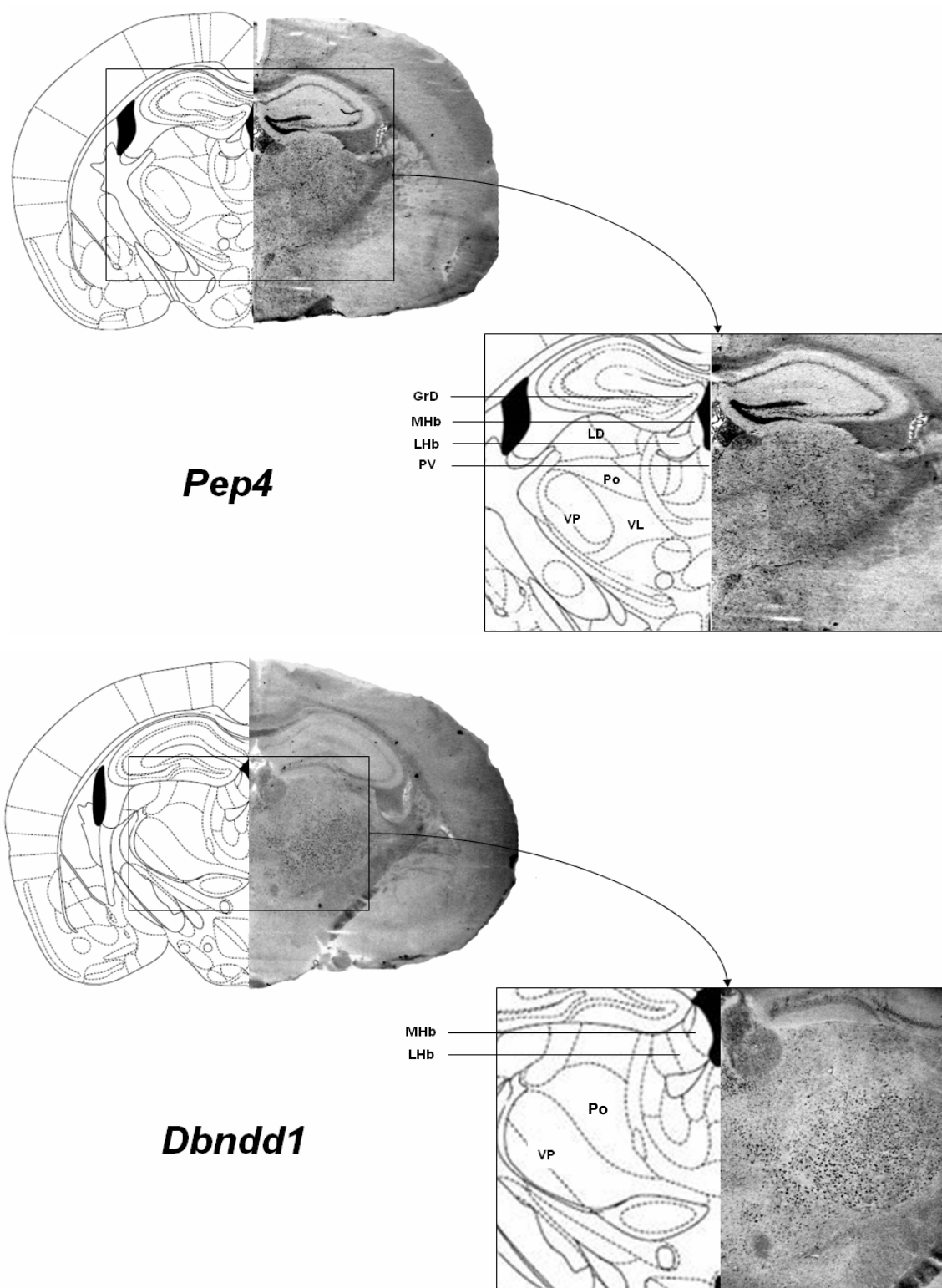


Figure 28. Visualisation de deux ARNm enrichis dans le thalamus par hybridation *in situ*. Les patterns d'expression de *Pep4* et *Dbnddl* ont été étudiés respectivement sur des coupes coronales de 1.5 et 1.9 mm postérieurement au bregma. GrD : gyrus denté ; MHb : Habenula médiane ; LD : noyau thalamique latérodorsal ; LHb : habenula latérale ; Po : groupe nucléaire thalamique postérieur ; PV : noyau thalamique paraventriculaire ; VL : noyau thalamique ventrolatéral ; VP : noyau thalamique ventropostérieur. Les représentations schématiques en vis-à-vis des coupes sont adaptées de l'atlas de Paxinos et Franklin, 2001.

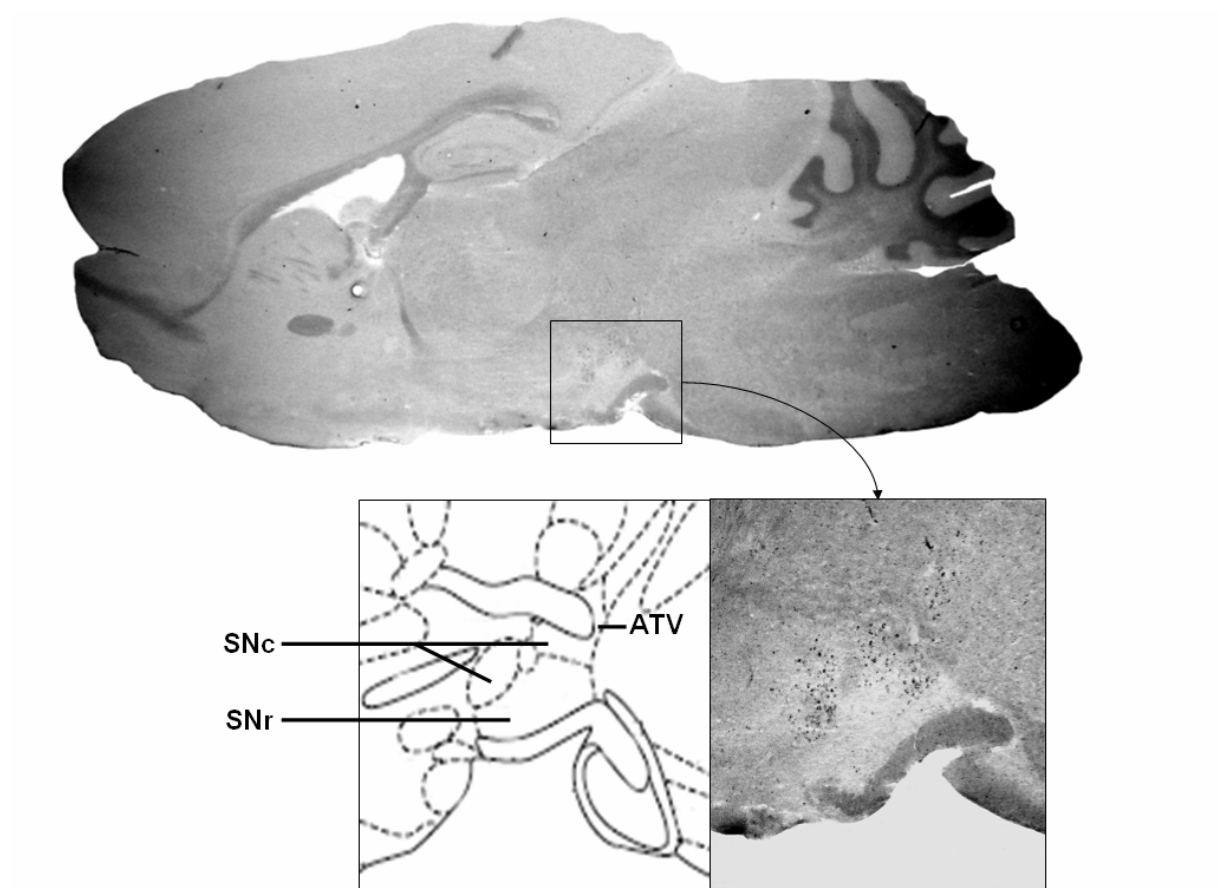


Figure 29. Visualisation de l'ARNm d'*Agpat4* par hybridation *in situ*. Coupe sagittale (1mm en latéral). SNc : substance noire compacte ; SNr : substance noire réticulée ; ATV : aire tegmentale ventrale. Les représentations schématiques en vis-à-vis des coupes sont adaptées de l'atlas de Paxinos et Franklin, 2001.

IV.2 Expression des marqueurs dans le modèle du « rat 6OHDA » de la maladie de Parkinson

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Elsa Diguët et Emmanuel Brouillet, Service Hospitalier Joliot-Curie, CEA – Orsay.

Nous avons voulu tester l'influence de l'injection de 6-OHDA dans le FMT du rat sur l'expression des transcrits régionaux, à la fois dans la substance noire, qui dégénère sous l'action de la toxine, et dans la région-cible des neurones dopaminergiques : le striatum. Les transcrits ont été quantifiés 24 h et 7 jours après injection stéréotaxique de la toxine. Evaluation de la dénervation dopaminergique induite par la 6-OHDA

IV.2.1.1 Analyse comportementale

Le test du cylindre permet d'évaluer les déficits moteurs (akinésie) induits par la lésion de la voie nigrostriatale. Ici, la lésion droite unilatérale des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte a entraîné une akinésie de la patte gauche, qui résulte en une réduction des appuis effectués avec cette patte (*cf.* figure 30a).

L'injection d'apomorphine a produit une rotation du côté contralatéral à la lésion (*cf.* figure 30b), ce qui d'après la littérature indique la destruction d'environ 90 % des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriatale (Ungerstedt, 1968 ; Schwarting et Huston, 1996).

IV.2.1.2 Contrôle histologique

La perte des neurones dopaminergiques des six animaux ayant reçu une injection unilatérale de 6-OHDA dans l'hémisphère droit a été vérifiée par l'immunohistochimie de la tyrosine hydroxylase. La figure 31 donne un exemple représentatif de l'immuno-marquage TH, 20 jours après l'injection de 6-OHDA. Du côté lésé, on observe la disparition du marquage au niveau de la SN compacte, et des fibres dopaminergiques au niveau striatal, ce qui suggère une perte des neurones dopaminergiques. Sur le côté lésé, il apparaît qu'une partie des neurones dopaminergiques de l'ATV a été épargnée par l'injection, mais l'absence de marquage du noyau accumbens et des tubercules olfactifs indique probablement une atteinte du système méso-limbique. Chez le rat 6-OHDA, du côté contralatéral à l'injection, comme chez le témoin, l'immuno-marquage de la TH est intense au niveau du striatum, du noyau accumbens, des tubercules olfactifs, de la SNc et de l'ATV.

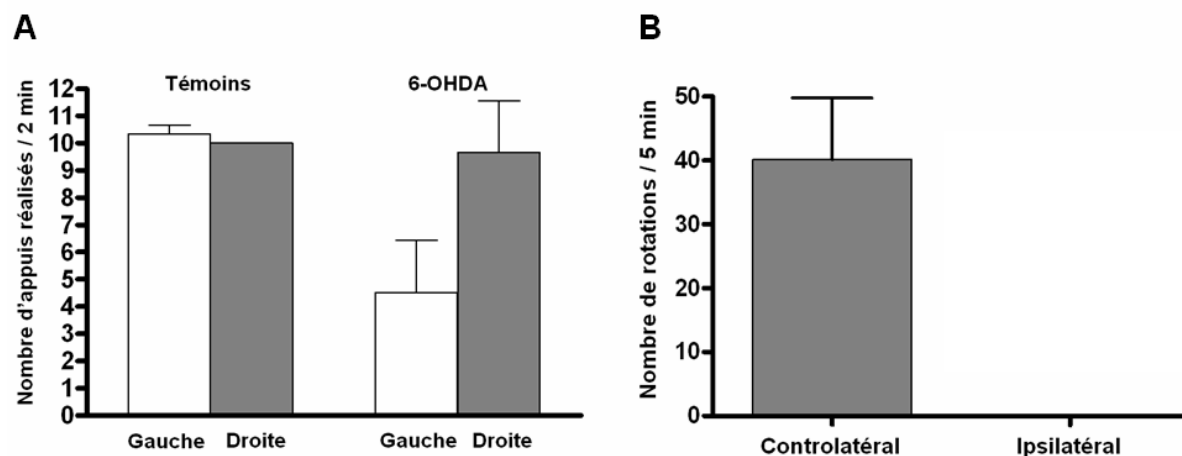


Figure 30. Analyse comportementale des rats intoxiqués à la 6-OHDA. **A.** Test du cylindre. Nombre d'appuis réalisés sur une période de deux minutes par les pattes antérieures gauche et droite des deux animaux témoins non injectés et des six animaux intoxiqués. **B.** Test de rotation à l'apomorphine. Nombre de rotations réalisées par les six animaux intoxiqués sur une période de cinq minutes du côté controlatéral ou ipsilatéral à l'injection de 6-OHDA.

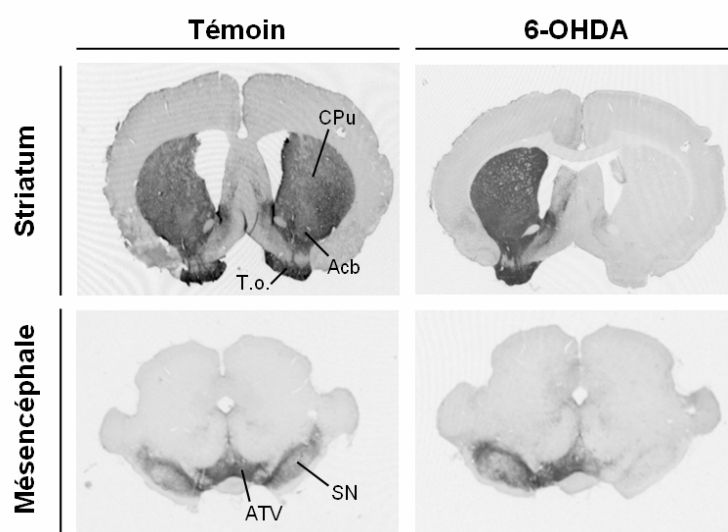


Figure 31. Contrôle de la dénervation dopaminergique. La perte des neurones dopaminergiques est visualisée par analyse immunohistochimique de la tyrosine hydroxylase sur des coupes coronales de cerveau de rat réalisées au niveau du striatum et de la substance noire. Notez la perte de fibres dopaminergiques dans le striatum et la substance noire du côté lésé. Acb, noyau accumbens ; ATV, aire tegmentale ventrale ; CPu, caudate-putamen ; SN, substance noire ; T.o., tubercule olfactif.

IV.2.2 Effets de l'intoxication à la 6-OHDA sur l'expression des gènes dans la substance noire et le striatum

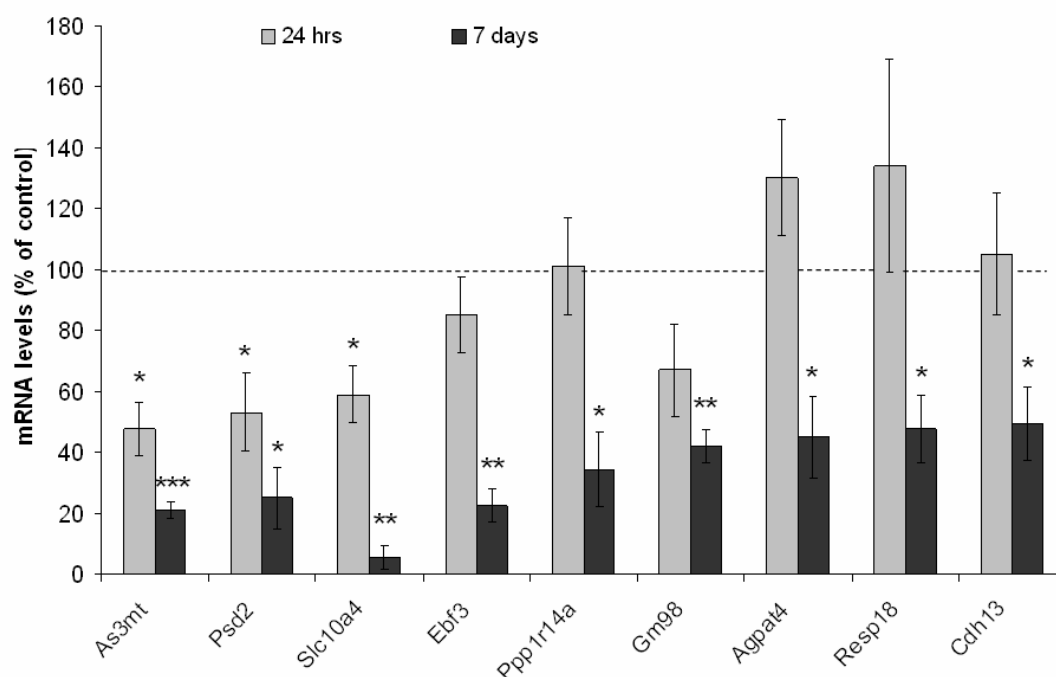
IV.2.2.1 *Les transcrits mésencéphaliques*

Nous avons quantifié, par qRT-PCR, l'expression des homologues chez le rat de 18 transcrits mésencéphaliques dans la substance noire d'animaux intoxiqués à la 6-OHDA et d'animaux témoins injectés avec une solution saline. Les niveaux d'abondance de la moitié des transcrits testés sont significativement altérés dans ce modèle de la MP (*cf.* figure 32a). L'expression de ces 9 marqueurs est réprimée 7 jours après l'injection de la toxine, et trois d'entre eux (*As3mt*, *Psd2* et *Slc10a4*) voient leur abondance significativement réduite dès 24 h post-intoxication.

IV.2.2.2 *Les transcrits striataux*

Les transcrits striataux ont été quantifiés dans les striata des mêmes rats afin de mettre en évidence des gènes potentiellement régulés par la perturbation de la voie nigrostriatale. Sur les 20 transcrits striataux testés, 3 sont induits de façon transitoire 24 h après l'injection (*Commd8*, *Scn4b* et *Nexn*), et 2 sont induits une semaine après injection (*Spock3* et *Myt1l*) (*cf.* figure 32b).

A



B

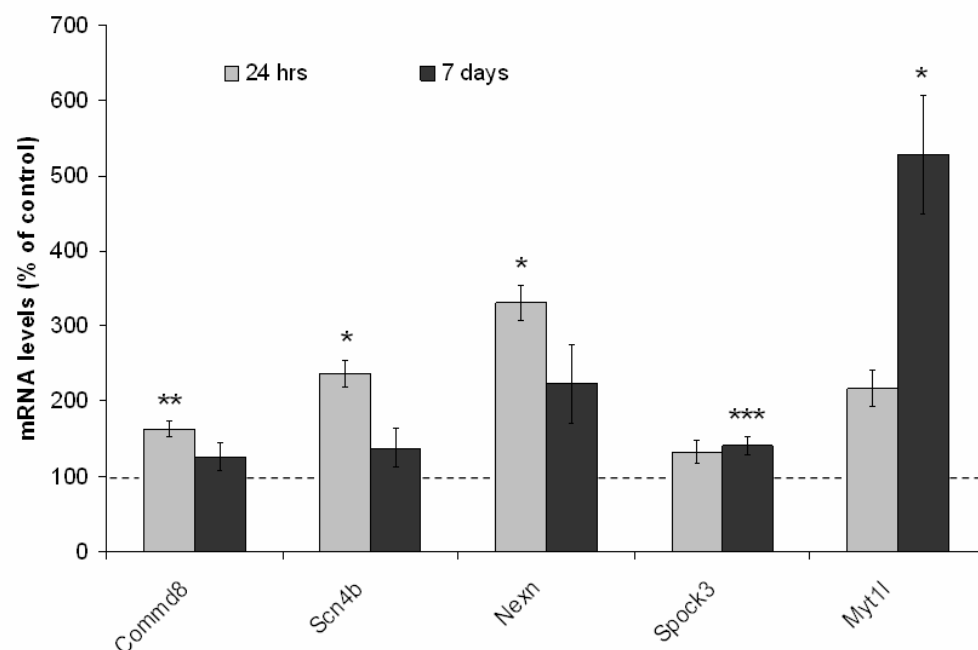


Figure 32. Quantification par qRT-PCR des transcrits différentiellement distribués dans A la substance noire et B le striatum de rat traités à la 6-OHDA. Pour chaque transcrit, le niveau d'ARNm est exprimé en pourcentage de l'expression du témoin \pm SEM. Les ARNm quantifiés sont enrichis (a) dans le mésencéphale ou (b) dans le striatum. Les astérisques indiquent la significativité des différences calculée avec le test *t* de Student : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Chaque colonne indique la valeur moyenne obtenue pour 4 animaux 24 h après injection et 3 animaux 7 jours après injection.

V DISCUSSION

V.1 Gènes différentiellement exprimés

Dans cette étude, nous avons généré plus d'un million d'étiquettes SAGE pour explorer le phénotype moléculaire de 11 régions du télencéphale et du mésencéphale, avec une profondeur d'analyse permettant la détection de transcrits présents à 0,006 % (5 / 80 000 tags). L'examen des banques SAGE nous a permis de sélectionner 308 transcrits différentiellement exprimés dans les régions étudiées. Les gènes mis en évidence par cette analyse se répartissent sur une large gamme de niveau d'expression. Ainsi, il est possible de détecter des transcrits dont les abondances diffèrent de plus d'un facteur 20 au sein d'un même tissu (*e. g.*, dans la banque de striatum : *Penk1*, $n = 122$ et *AA474455*, $n = 5$; dans la banque d'ATV *Th*, $n = 174$ et *Agpat4*, $n = 7$; les banques étant normalisées à 80 000 tags). La possibilité de comparer les niveaux d'expression des gènes dans un même échantillon est un avantage incontestable de SAGE qui génère des données quantitatives directement interprétables. La fiabilité des résultats de l'analyse SAGE a été démontrée plusieurs fois à l'occasion de ce travail. Tout d'abord, la plupart de nos résultats présentent une bonne corrélation avec les données existant dans la littérature (*cf.* publication n°2, table S2). Par ailleurs, le profil d'expression des gènes sélectionnés pour être différentiellement exprimés a été confirmé par des expériences de RT-PCR quantitative et, dans certains cas, d'hybridation *in situ* (*cf.* publication n°2, table S3).

Les 308 marqueurs ne sont pas distribués de façon équivalente entre les banques (*cf.*, publication n°2, table S1). Dans notre étude, c'est le striatum qui compte le plus de marqueurs, et les cortex qui en comptent le moins. Il y a trois explications plausibles à l'obtention de ces résultats. Tout d'abord, une limitation technique liée au nombre de tags séquencés dans notre étude, qui ne fournit pas un catalogue complet de l'expression des gènes dans les différentes régions cérébrales. Ensuite, lors de la comparaison des régions, la limite inférieure d'abondance des tags enrichis a été fixée à 5 / 80 000. Pour un tissu homogène (c'est-à-dire composé d'un seul type cellulaire), cela correspond à 20 copies d'ARNm / cellule (Clarke & Carbon, 1976). Pour un tissu hétérogène comme le cerveau, les ARNm présents à cette abondance ne peuvent évidemment pas être détectés s'ils sont présents dans un type cellulaire minoritaire (Levitt *et al.*, 1997). La deuxième hypothèse permettant d'interpréter les données obtenues serait donc que plus le tissu est « simple », plus les différences d'expression

existantes sont faciles à observer. Enfin, il est clair que notre *corpus*, comportant 50 % de banques générées à partir de régions corticales, permet plus facilement de faire apparaître comme spécifiques les transcrits des autres régions du cerveau.

L'étude des marqueurs SAGE par hybridation *in situ* a permis de confirmer l'enrichissement régional de l'ensemble des transcrits testés à un niveau de résolution cellulaire. Ainsi, l'hybridation *in situ* des ARNm enrichis dans le cortex révèle une expression différentielle entre les différentes couches corticales plutôt qu'entre des régions fonctionnellement distinctes. Dans certains cas, l'analyse SAGE et la RT-PCR quantitative laissaient déjà supposer l'obtention d'un tel résultat. En effet, les ARNm de *Mark2* et *3110035E14Rik* auraient une distribution plutôt pan-corticale d'après SAGE, en dépit de l'existence de variations d'expression d'une région à une autre. Par ailleurs, l'HIS de *Gm705* montre que son expression suit un gradient dorsoventral au sein du striatum. De plus, l'étude de deux marqueurs thalamiques, *Pep4* et *Dbnndl1*, révèle des patterns d'expression distincts pour ces deux marqueurs, avec une distribution plutôt ubiquitaire de *Pep4* au sein du thalamus, et au contraire limitée à certains noyaux pour *Dbnndl1*. Ces nuances de distribution, qui ne pouvaient pas être détectées par SAGE ou RT-PCR quantitative, constituent une information précieuse pour approcher les fonctions des différents marqueurs. En effet, le thalamus est une structure complexe, constituée de nombreux noyaux impliqués dans des fonctions variées, comme la motricité volontaire pour les noyaux centromédians et latéropostérieurs, et le système limbique pour les noyaux parafasciculaires et médiodorsaux (*cf.* introduction). Enfin, nous avons pu déterminer que trois marqueurs du mésencéphale ventral, *A930038C07Rik*, *Slc10a4* et *Agpat4*, étaient exprimés dans la *pars compacta* de la substance noire et dans l'aire tegmentale ventrale, ce qui nous a naturellement conduit à supposer que ces gènes étaient exprimés par les neurones dopaminergiques. Cette hypothèse a été confirmée ensuite par la colocalisation de leur expression avec la tyrosine hydroxylase (*cf.* publication n°2, figure 2).

V.2 Classification fonctionnelle des transcrits présentant un enrichissement régional

Afin de mettre en évidence une éventuelle spécialisation fonctionnelle des régions, nous avons classé l'ensemble des transcrits différentiellement exprimés dans différentes catégories fonctionnelles correspondants à des processus biologiques répertoriés dans la base de données *Gene Ontology* (Ashburner *et al.*, 2000) (*cf.* publication n°2, figure

supplémentaire 1). De nombreux gènes impliqués dans la transduction du signal ont été mis en évidence dans l'ensemble des régions. Cette classe est significativement surreprésentée dans le striatum, ce qui concorde avec les résultats d'une étude récente (Stansberg *et al.*, 2007). De plus, la surreprésentation de la catégorie *locomotory behavior* dans les sets de gènes spécifiquement exprimés dans le striatum ou le mésencéphale ventral, est cohérente avec la fonction assurée par ces régions dans le contrôle de la motricité volontaire. Par ailleurs, il y a significativement plus de gènes impliqués dans le développement du système nerveux dans le mésencéphale ventral. Ceci est potentiellement interprétable par les données de la littérature, d'après lesquelles la neurogenèse se déroulerait dans le cerveau adulte non seulement au niveau des bulbes olfactifs et de l'hippocampe (Kempermann *et al.*, 2004) mais aussi dans la substance noire (Zhao *et al.*, 2003).

V.3 Conservation des patterns d'expression chez l'homme

Ces dernières années, la souris est devenue l'organisme le plus utilisé pour modéliser les maladies humaines neurologiques et neurodégénératives. L'analyse comparative de l'expression des gènes dans les cerveaux de souris et d'homme devrait évaluer la pertinence du modèle murin pour l'étude de pathologies humaines. Nos données montrent que les patterns d'expression génique entre des régions comparables du cerveau humain et du cerveau murin sont généralement conservés. Ceci est cohérent avec les données neuroanatomiques qui proposent une conservation générale des grandes structures cérébrales et des types cellulaires entre régions comparables (Braitenberg, 1998). Plusieurs études ont récemment montré que les gènes ayant les plus grandes différences d'expression d'un tissu à l'autre étaient également ceux qui présentaient la meilleure conservation de séquence entre l'homme et la souris (Liao & Zhang, 2006; Strand *et al.*, 2007).

Néanmoins, certains marqueurs régionaux chez la souris ne semblent pas avoir un profil d'expression similaire chez l'homme. Nos données sous-estiment probablement la corrélation qui existe entre les profils d'expression géniques chez les deux espèces, en raison de facteurs tels que la qualité des ARN (liée notamment au délai *post-mortem* et à la dissection des tissus), le stress (ischémie), la prise de médicaments, l'état de santé, l'âge et le genre des individus, qui ne sont pas strictement contrôlés. De plus, nous comparons de petites régions cérébrales murines à des structures entières de cerveau humain (*e.g.*, cortex entorhinal vs lobe temporal), ce qui génère probablement des différences de composition en types

cellulaires. On ne peut pas non plus exclure la possibilité de mesurer l'expression de différents variants d'épissage d'une espèce à l'autre.

Quoiqu'il en soit, ces résultats valident globalement l'utilisation de modèles murins, et laissent supposer qu'un modèle récapitulant une pathologie humaine puisse avoir le même profil transcriptionnel.

V.4 Expression génique dans le modèle R6/2

A de rares exceptions près, les études réalisées pour explorer les maladies neurodégénératives ont comparé le profil d'expression de l'ensemble des gènes dans les conditions normales et pathologiques, sans toutefois se pencher sur le problème de la régionalisation de l'expression, c'est-à-dire sans favoriser l'étude des gènes dont l'expression prédomine dans les régions spécifiquement touchées par ces pathologies.

Luthi-Carter *et al.*, ont publié la première étude utilisant les puces à ADN pour mesurer l'expression de 6000 gènes dans le striatum de souris R6/2 (Luthi-Carter *et al.*, 2000). Seul un petit nombre de gènes (environ 2%) présentaient une altération de leur expression, et il s'agissait majoritairement d'une répression. La plupart des gènes induits étant liés à l'inflammation, la régulation de leur expression a été interprétée comme un processus de compensation. Les gènes réprimés codaient pour la plupart des composants des voies de signalisation des neurotransmetteurs, du calcium et des rétinoïdes. Par ailleurs, cette étude a montré que les changements d'expression n'étaient pas un phénomène atteignant les transcrits striataux de façon globale et que certains gènes connus pour être exprimés dans les neurones épineux moyen, comme la preprotachykinine, voyaient leur niveau d'expression inchangé.

Des études récentes sur des modèles de souris transgéniques et chez des patients atteints de la maladie de Huntington suggèrent que certains facteurs spécifiques au striatum le rendraient plus susceptibles à la dérégulation transcriptionnelle (Desplats *et al.*, 2006; Gomez *et al.*, 2006; Hodges *et al.*, 2006).

Dans notre étude, la plupart des gènes régulés dans le modèle R6/2 n'ont pas d'annotation fonctionnelle (catégorie *unknown*, cf. table 7). Comme les études à grande échelle précédentes (Desplats *et al.*, 2006; Luthi-Carter *et al.*, 2002a; Luthi-Carter *et al.*, 2000; Luthi-Carter *et al.*, 2002b), nous mettons également en évidence des gènes impliqués dans la signalisation. La régulation de cette catégorie de gènes dans le contexte pathologique de la MH avait déjà été mise en évidence par des études ciblées. Ainsi, la signalisation du

calcium semble altérée, comme le montre la répression transcriptionnelle de la protéine-kinase C beta II dans le striatum et le cortex du modèle R6/2 (Harris *et al.*, 2001). Par ailleurs, la baisse de l'expression de *Ppp1r1b* (*dopamine and cAMP regulated phosphoprotein*, DARPP-32) a été détectée dans les modèles R6/2 (Bibb *et al.*, 2000) et R6/1 (van Dellen *et al.*, 2000) de la MH.

L'existence de gènes corégulés pourrait indiquer la présence de sites de fixation pour une même famille de facteurs de transcription sur leurs promoteurs. En effet, une étude antérieure a déjà permis de découvrir des sites de fixation des facteurs de transcription Sp sur les promoteurs de gènes réprimés dans le modèle R6/2 (Luthi-Carter *et al.*, 2002a). Aussi, il serait intéressant d'analyser les séquences promotrices des gènes étudiés ici, d'autant que plusieurs publications décrivent les conséquences de l'interaction directe de la huntingtine mutante avec des facteurs de transcription spécifiques (Sugars & Rubinsztein, 2003). De plus, l'étude d'une lignée transgénique R6/2 modifiée de telle sorte que le transgène possède une séquence de localisation nucléaire, a montré que le phénotype des animaux était aggravé, ce qui va dans le sens d'un rôle crucial de l'altération de la transcription dans la pathologie (Benn *et al.*, 2005).

Bien que l'altération de l'expression de gènes spécifiquement exprimés dans le striatum soit établie, la régulation transcriptionnelle induite par la huntingtine mutante ne semble pas se limiter à cette région. Nos données transcriptomiques concordent avec la mise en évidence d'une altération du cortex chez des malades à des stades précoces de la maladie de Huntington (Rosas *et al.*, 2003). De plus, Hodges *et al.* (2006) ont également détecté la régulation d'un certain nombre de gènes dans le cortex moteur de patients atteints de la MH. Dans notre étude, 5 marqueurs corticaux présentent une expression affaiblie dans le cortex des souris R6/2. Deux d'entre eux n'ont pas de fonction connue (*Dkk1* et *Cpne9* ; cf. table 7). En revanche, il a été démontré dans des cellules JEG3 (choriocarcinome) que le facteur de transcription CREB (*cAMP response element (CRE) binding protein*) possédait un site de fixation sur le promoteur du gène *Dio2*, et en activait la transcription en présence d'AMPC (Canettieri *et al.*, 2004). Cette observation est particulièrement importante, dans la mesure où il est maintenant acquis que les protéines à polyglutamine altèrent la transcription médiée par CRE (Wytenbach *et al.*, 2001). Par ailleurs, le gène *Kalrn* code la kalirine, qui interagit avec HAP1 (*huntingtin-associated protein 1*) (Colomer *et al.*, 1997), protéine dont l'interaction physique avec la huntingtine a été démontrée (Li *et al.*, 1995).

V.5 Expression génique dans les modèles « MPTP » et « 6-OHDA »

V.5.1 Altération des transcrits striataux dans le modèle « MPTP »

La signalisation dopaminergique est connue pour réguler l'expression des gènes dans le striatum (Berke *et al.*, 1998). Parmi les 23 marqueurs striataux testés, 11 présentent une altération de leur expression suite à une intoxication aiguë au MPTP, et se répartissent en trois types de réponse : *i*) une répression précoce transitoire 24 h post-intoxication ; *ii*) une induction précoce transitoire 24 h post-intoxication ; *iii*) une induction tardive 7 jours post-intoxication.

Les gènes régulés appartiennent à trois principales catégories fonctionnelles : la transduction du signal (*Gpr155*, *Lypd1*, *Mctp1*), le métabolisme cellulaire (*Carhsp*, *Wfs1*), le transport (*Scn4b*, *Slc41a1*), et quatre d'entre eux n'ont pas de fonction connue (*Nexn*, *Spock3*, *Sp9*, *Dclk3*). Une explication évidente aux différences d'expression induites par le MPTP serait que les gènes concernés sont régulés par une cascade de signalisation dépendante de l'innervation dopaminergique. Vingt-quatre heures après injection de la drogue, il est probable que les modifications transcriptionnelles observées soient liées à la baisse drastique et brutale de la libération de dopamine par les neurones nigrostriataux plutôt qu'à une conséquence de leur neurodégénérescence, ce qui pourrait expliquer le caractère transitoire de ces modifications. En effet, la mort cellulaire induite par le MPTP n'est pas observée avant le 5^{ème} jour suivant l'intoxication (Jackson-Lewis *et al.*, 1995).

Une étude antérieure par puces à ADN a analysé la régulation de l'expression des gènes dans le striatum de souris, 24 heures et 7 jours après la dernière injection de MPTP, dans un modèle d'intoxication chronique (Miller *et al.*, 2005). La majorité des modifications transcriptionnelles a été observée une semaine après l'injection, et concerne des gènes codant des protéines du cytosquelette, d'adhésion, du système ubiquitine-protéasome, du cycle cellulaire, ou encore de la réponse au stress oxydatif. Ces résultats indiquent une réponse globale du génome à l'intoxication, plutôt qu'une régulation ciblée de gènes préférentiellement exprimés dans le striatum.

V.5.2 Altération des transcrits striataux dans le modèle « 6-OHDA »

Dans notre étude, l'injection de 6-OHDA dans le FMT de rat entraîne, vingt-quatre heures ou sept jours plus tard, une hausse des abondances de 5 des 20 transcrits testés dans le

striatum. Ces transcrits codent respectivement : une protéine sans fonction connue (*Commd8*) ; une protéine interagissant avec le cytosquelette (*Nexn*) (Ohtsuka *et al.*, 1998) ; une protéine de la matrice extracellulaire (*Spock3*) (Nakada *et al.*, 2001) ; un facteur de transcription neuronal (*Myt1l*) (Kim *et al.*, 1997) ; et une sous-unité d'un canal sodique (*Scn4b*).

Ce modèle n'est pas classiquement utilisé dans la littérature, ce qui rend nos données difficilement comparables à des résultats antérieurs, mais il a été démontré que la mort des cellules dopaminergiques intervenait dès 12 h après l'injection de 6-OHDA dans la substance noire ou le FMT (Jeon *et al.*, 1995).

Une étude par puces à ADN de la toxicité de la 6-OHDA a identifié une cinquantaine d'ARNm dont les abondances étaient modifiées dans le striatum de rat deux mois après l'injection unilatérale de la toxine dans la substance noire (Napolitano *et al.*, 2002). Parmi les gènes dérégulés, 27 sont réprimés et 14 voient leur niveau d'expression augmenter. Deux des 14 gènes induits codent des kinases (CDK5, *Cyclin-dependent kinase et PKA* *subunit C*), connues pour réguler DARPP-32, un médiateur de la transmission du signal dopaminergique de la substance noire au striatum (Fernandez *et al.*, 2006). Cependant, la plupart des gènes régulés dans cette étude ne semble pas exercer des fonctions spécifiques au sein du striatum.

V.5.3 Altération des transcrits mésencéphaliques dans le modèle « 6-OHDA »

Nous avons également étudié la régulation des transcrits enrichis dans le mésencéphale, en quantifiant leur expression dans la substance noire de rats traités à la 6-OHDA. Sur les 14 transcrits testés, 9 voient leurs abondances significativement réduites 7 jours après l'intoxication, dont 3 (*As3mt*, *Psd2* et *Slc10a4*) dès les premières 24 h. *As3mt* est une méthyltransférase cytoplasmique impliquée dans la détoxification de l'arsenic (Li *et al.*, 2005) et *Slc10a4* est un transporteur de la famille des symporteurs sodium/acide biliaire (Splinter *et al.*, 2006) mais leur fonction est peu documentée. En revanche, *Psd2* régule ARF6 (ADP-ribosylation factor), connu pour être localisé dans la membrane des endosomes, et pourrait jouer un rôle dans l'endocytose et le recyclage des membranes ainsi que dans certains aspects de l'assemblage de l'actine cytosquelettique (Donaldson, 2003). Le trafic membranaire et la réorganisation du cytosquelette sont des mécanismes fondamentaux de régulation de la différenciation neuronale au cours du développement aussi bien que de la libération et la recapture de neurotransmetteurs chez l'adulte (Sudhof, 2004). Il a été montré

qu'ARF6 était impliqué dans plusieurs fonctions neuronales dont l'endocytose et l'exocytose de vésicules présynaptiques et l'internalisation des récepteurs (Claing *et al.*, 2001; Galas *et al.*, 1997; Hernandez-Deviez *et al.*, 2004).

Parmi les gènes régulés par l'injection de 6-OHDA dans la substance noire se trouve celui codant la cadhérine 13. Les cadhérines sont notamment impliquées dans la formation et le maintien des synapses au cours du développement (Takai *et al.*, 2003). Une étude par puce à ADN chez des patients parkinsoniens a récemment mis en évidence la baisse de l'expression des gènes codant les cadhérines 9, 12, 18, 7 et 10 dans le striatum. Ceci pourrait indiquer un défaut d'adhésion au niveau synaptique entre les neurones nigraux et striataux, ce qui va dans le sens de l'hypothèse de dégénérescence rétrograde des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriatale.

Plusieurs des gènes régulés dans notre modèle sont impliqués dans la signalisation (*Ppp1r14a*, *Agpat4*, *Resp18*) ou la transcription (*Ebf3*) et pourraient donc appartenir à des voies de signalisation altérées par l'action de la 6-OHDA sur les neurones dopaminergiques de la substance noire. *Ppp1r14a* est également connu sous le nom de *CPI-17* (*cytosolic protein 17kDa*). Cet inhibiteur de protéines phosphatases intervient notamment dans la voie de signalisation des récepteurs opioïdes delta aboutissant à la contraction prolongée des muscles lisses (Huang *et al.*, 2006). *Agpat4* (1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase, delta) catalyse le transfert d'un acide gras à partir d'un donneur acyl vers la position sn-2 de l'acide lysophosphatidique. Cette réaction conduit à la formation d'acide phosphatidique (Kent, 1995). *Agpat4* participerait ainsi à la biosynthèse des membranes biologiques. Par ailleurs, il a été montré que plusieurs membres de la famille des *Agpat* (*Agpat2* et *Agpat8*) étaient capables d'activer la voie de signalisation mTOR (*mammalian target of rapamycin*) dans des lignées cellulaires (Springett *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006). *Resp18* (Regulated endocrine-specific protein-18) est connu pour être transcriptionnellement régulé par la dopamine dans l'hypophyse (Bloomquist *et al.*, 1994). RESP18 est localisée dans la lumière du réticulum endoplasmique des cellules endocrines et des neurones peptidergiques et participerait à une voie de signalisation intracellulaire neuroendocrine (Schiller *et al.*, 1997). *Ebf3* est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des neurones dopaminergiques du mésencéphale (Thuret *et al.*, 2004). Par ailleurs, *Ebf3* induit l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, réprime les gènes impliqués dans la survie et la prolifération et est inactivé dans les tumeurs cérébrales (Zhao *et al.*, 2006). Enfin, *Gm98* possède un domaine de fixation à l'ADN, ce qui laisse supposer que lui aussi interviendrait dans la régulation de l'expression génique.

V.6 Gènes régulés dans plusieurs modèles

Trois transcrits sont régulés dans les deux modèles de la MP mais selon une séquence temporelle différente (*cf.* figure 33) : le niveau d'ARNm de *Scn4b* est augmenté dans le striatum de souris 7 jours après l'administration de MPTP, alors qu'il est accentué de façon transitoire dans le striatum de rat, 24 h après l'injection de 6-OHDA ; *Spock3* est réprimé à 24 h post-intoxication au MPTP, et induit 7 jours après l'injection de 6-OHDA ; enfin, *Nexn* qui est d'abord réprimé puis induit dans le modèle MPTP, voit son niveau d'expression augmenter transitoirement dans le modèle 6-OHDA. Notre étude s'intéressant au striatum, on pouvait s'attendre à observer le même type de réponse transcriptionnelle dans les deux modèles de la MP, lié à la déafférentation dopaminergique plutôt qu'aux mécanismes de toxicité spécifiques du MPTP et de la 6-OHDA. Quoiqu'il en soit, des différences fondamentales existent entre les deux modèles. Dans le « modèle MPTP », la toxine a été administrée à la souris par voie systémique ce qui aboutit à une dégénérescence bilatérale et spécifique des neurones dopaminergiques de la substance noire (Sonsalla & Heikkila, 1986). Dans le « modèle 6-OHDA », l'intoxication a été réalisée par injection stéréotaxique unilatérale dans le FMT du rat ce qui provoque la dégénérescence des neurones catécholaminergiques (Luthman *et al.*, 1989). De plus, une étude plus récente a montré qu'après injection d'une forte dose de 6-OHDA dans le FMT, et en dépit de la perte des neurones dopaminergiques de la substance noire, les niveaux de dopamine extracellulaire étaient encore proches de la normale (Sarre *et al.*, 2004). Ce phénomène pourrait trouver son explication dans l'existence d'une libération somatodendritique de dopamine par les quelques neurones nigraux épargnés par l'injection de la toxine. Ceci est peut être la raison pour laquelle nous obtenons des résultats si différents dans les modèles MPTP et 6-OHDA de la MP, et pourrait expliquer le fait qu'un faible nombre de gènes soit régulé dans ce dernier.

Bien que plusieurs données montrent que la neurotoxicité de la 6-OHDA provoque des altérations moléculaires comparables à celles observées dans la MP (Blum *et al.*, 2001), on peut s'interroger sur la validité des modèles pharmacologiques pour des analyses moléculaires fines, comme la régulation de l'expression des gènes. Cette question est particulièrement valable pour la 6-OHDA car la lésion et les mécanismes moléculaires de cytotoxicité qu'elle recrute pourraient être variables entre les cellules, en fonction de leur localisation par rapport au site d'injection.

Notre analyse met également en évidence la régulation de l'expression de 5 gènes préférentiellement exprimés dans le striatum, à la fois dans le modèle R6/2 de la MH et dans le modèle MPTP de la MP (*cf.* figure 33). Cette observation laisse supposer l'existence d'une possible voie de signalisation commune entre les deux modèles. Cette hypothèse est appuyée par les observations de Charvin *et al.*, qui se sont interrogés sur l'influence de l'innervation dopaminergique sur des cultures de neurones striataux exprimant la huntingtine mutée. Cette étude montre en effet le rôle potentiel de la dopamine dans le processus pathologique de la MH, *via* l'activation de la voie JNK mais aussi *via* la signalisation des récepteurs dopaminergiques D2 (Charvin *et al.*, 2005). Ainsi, dans notre étude, les gènes dont l'expression est régulée lors de la déafférentation dopaminergique du striatum dans le modèle MPTP, ainsi que dans le modèle R6/2, pourraient être sous le contrôle d'un même facteur transcriptionnel dont l'activité serait altérée à la fois par la dopamine et la huntingtine mutée.

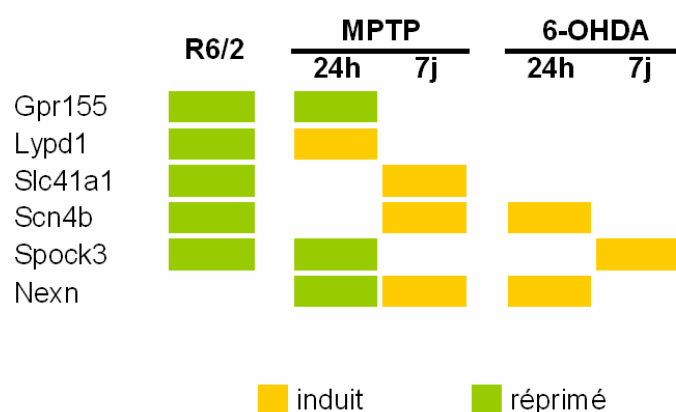


Figure 33. Transcrits enrichis dans le striatum dont l'expression est affectée dans plusieurs modèles de maladies neurodégénératives.

Modèle	Région	Gène	GOTERM - Processus biologique (niveau 3)
R6/2	Caudé-putamen	Gpr155	signal transduction
		Lypd1	
		Sh2d5	
		St8sia3	cellular metabolism, macromolecule metabolism, primary metabolism
		1110018G07Rik	
		Slc41a1	
		Scn4b	establishment of localization, transport
		Tesc	cell homeostasis, ion homeostasis
		Crym	nervous system development
		Gm705	unknown
	Cortex	2010001M06Rik	
		Spock3	
		BC072620	
		Tmem90a	
		Stac2	signal transduction
		Kalrn	cellular metabolism, macromolecule metabolism, primary metabolism
		Dio2	biosynthesis, catabolism, cellular metabolism, nitrogen compound metabolism, primary metabolism
		Dkk1	unknown
		Cpne9	
MPTP	Caudé-putamen	Gpr155	signal transduction
		Lypd1	
		Mctp1	
		Carhsp1	cellular metabolism, primary metabolism, regulation of cellular physiological process, regulation of metabolism
		Wfs1	biosynthesis, cellular metabolism, macromolecule metabolism, primary metabolism
		Slc41a1	establishment of localization, transport
		Scn4b	
		Nexn	
		Spock3	Unknown
		Sp9	
6-OHDA	Caudé-putamen	Dclk3	
		Myt1l	cellular metabolism, nervous system development, primary metabolism, regulation of cellular physiological process, regulation of metabolism
		Scn4b	establishment of localization, transport
		Nexn	Unknown
		Spock3	
	Substance noire	Commd8	
		As3mt	
		Ebf3	cellular metabolism, response to chemical stimulus, secondary metabolism
		Agpat4	cellular metabolism, positive regulation of cellular process, positive regulation of physiological process, primary metabolism, regulation of cellular physiological process, regulation of metabolism
		Slc10a4	biosynthesis, cellular metabolism, primary metabolism
		Cdh13	establishment of localization, transport
		Ppp1r14a	cell growth, cell organization and biogenesis, cell-cell adhesion, cellular morphogenesis, regulation of cell growth, regulation of cellular physiological process
		Gm98	Unknown
		Psd2	
		Resp18	

Table 7. Classification fonctionnelle des transcrits régulés en conditions physiopathologiques. Les catégories fonctionnelles correspondent au terme *Gene Ontology* du processus biologique.

I INTRODUCTION

I.1 Données bibliographiques sur les 1-acylglycérol-3-phosphate O-acyltransférases

L'acide lysophosphatidique acyltransférase (LPAAT), plus récemment appelée 1-acyl-sn-glycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT), est l'enzyme qui catalyse le transfert d'un acide gras à partir d'un donneur acyl vers la position *sn*-2 le l'acide lysophosphatidique (ALP). Cette réaction conduit à la formation d'acide phosphatidique (AP) (Kent, 1995). L'ALP et l'AP sont impliqués à la fois dans la biosynthèse des lipides (*cf.* figure 34) et la transduction du signal dans les cellules. L'acide phosphatidique est notamment connu en tant que second messager participant à des voies de signalisation cellulaire et régulant une liste grandissante de protéines kinases et phosphatases (English *et al.*, 1996).

Les AGPATs forment une famille d'au moins 7 protéines. En effet, une séquence similaire a récemment été mise en évidence et appelée AGPAT8 (Tang *et al.*, 2006). AGPAT 1 et 2 sont relativement bien caractérisées et leur activité enzymatique documentée, alors que les autres membres de la famille ont été identifiés sur la base de leur homologie de séquence, ou de très modestes niveaux d'activité. Plusieurs mutations d'AGPAT2 ont été détectées chez des patients atteints de lipodystrophie congénitale généralisée, connue également sous le nom de syndrome de Berardinelli-Seip (Agarwal & Garg, 2003). Cette maladie autosomique récessive est caractérisée par une perte presque totale de la masse adipeuse, et une sévère résistance à l'insuline. Par ailleurs, l'inactivation d'*Agpat6* chez la souris conduit à un défaut dans l'accumulation des triglycérides dans les graisses jaunes et brunes, en particulier dans la région sub-dermique (Vergnes *et al.*, 2006).

Enfin, il est maintenant clairement établi que les AGPAT jouent un rôle dans la signalisation cellulaire. En effet, le rôle d'AGPAT2 a été récemment mis en évidence dans certaines voies de signalisations associées à l'oncogenèse, incluant ras/raf/Erk et Akt/mTOR (*cf.* figure 35) (Springett *et al.*, 2005). De plus, AGPAT8 est capable de provoquer la phosphorylation de mTOR et du répresseur traductionnel 4EBP1 dans des cellules HEK293T (Tang *et al.*, 2006).

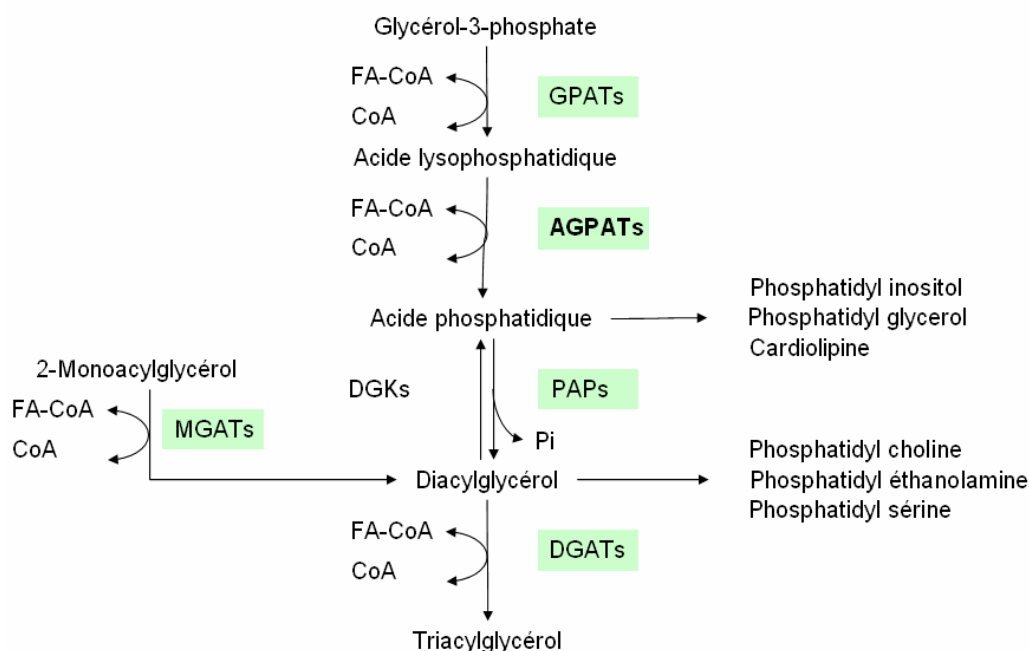


Figure 34. Voies de biosynthèse du triacylglycérol.

Alors que les GPATs (glycérol-3-phosphate acyltransférase) et DGATs (diacylglycérol acyltransférase) catalysent la première et la dernière étape de la synthèse des triglycérides, les AGPATs (1-acylglycérol-3-phosphate O-acyltransférases) interviennent à un stade intermédiaire. DGK : diacylglycérol kinase ; MGAT : monoacylglycérol-acyltransférase ; PAP : phosphatidate phosphohydrolase.

Nous avons vu dans les chapitres précédents qu'*Agpat4* était préférentiellement exprimé dans les neurones immuno-positifs pour la tyrosine hydroxylase de la substance noire compacte et de l'aire tegmentale ventrale (*cf.* figure 2, publication n°2). Par ailleurs, sa distribution dans les différentes régions cérébrales semble conservée chez l'homme (*cf.* figure supplémentaire 2, publication n°2). Enfin, chez le rat intoxiqué à la 6-OHDA, l'expression d'*Agpat4* dans la substance noire est significativement réprimée une semaine post-injection, ce qui indique son rôle potentiel dans la réponse des neurones dopaminergiques à la toxine.

Afin de caractériser la fonction assurée par AGPAT4 dans le cerveau, nous avons décidé de générer des animaux transgéniques *Agpat4*^{-/-} en utilisant une lignée de cellules souches embryonnaires (ES) inactivées pour ce gène et disponibles dans les banques publiques de cellules ES issues de la stratégie *Gene Trap*.

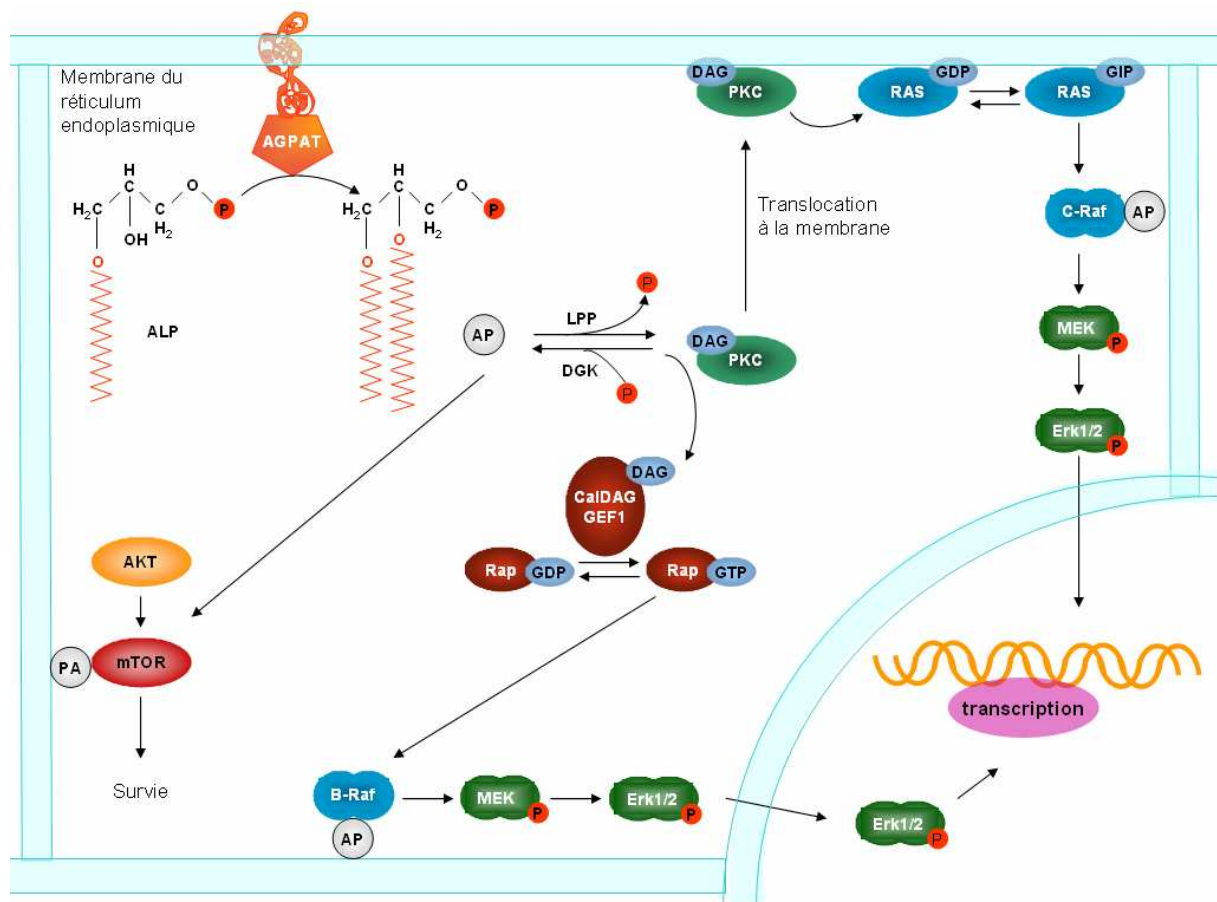


Figure 35. Modélisation de la fonction d'AGPAT2 et de la signalisation par l'acide phosphatidique. Dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE), AGPAT2 génère de l'acide phosphatidique (AP) par addition d'une chaîne acyl en position *sn*-2 de l'acide lipophosphatidique (ALP). Dans la membrane, l'AP fixe mTOR et Raf, et contribue à leur activation. Une partie de l'AP est convertie en diacylglycérol (DAG) par la lipide phosphate phosphatase-3 (LPP), protéine intégrale localisée dans la membrane du RE. Si du DAG polyinsaturé est généré, il peut alors intervenir en temps que second messager auprès des membres de la famille des PKC et/ou des CalDAG-GEF (RasGRP). Les isoformes de la PKC se « translocalisent » à la membrane en réponse à la stimulation du DAG, et CalDAG-GEF1 (RASGRP2) participe à l'activation de Rap. Rap-GTP active alors B-Raf et la voie MEK/Erk. La PKC peut également réguler cette voie par son action sur Ras/c-Raf

D'après Springett et al., 2005.

I.2 La stratégie *Gene Trap*, ou « piégeage » de gènes.

Le *Gene Trap*, ou « piégeage » de gènes, est une stratégie d'inactivation qui a été développée à l'origine par Glosser *et al.* et ultérieurement par plusieurs autres laboratoires (Gossler *et al.*, 1989; Skarnes *et al.*, 1992; von Melchner *et al.*, 1992). Elle repose sur l'introduction de « pièges » à gènes dans le génome des cellules souches embryonnaires (cellules ES), qui ont la capacité de coloniser un embryon hôte, y compris sa lignée germinale, ce qui permet le transfert à l'animal d'une modification génétique introduite dans le génome des cellules ES.

D'une façon générale, tous les vecteurs de « piégeage » possèdent : *i)* un gène rapporteur qui d'ordinaire est le gène bactérien *lacZ* ; *ii)* un gène codant une protéine de résistance à un facteur de sélection, généralement la néomycine phospho-transférase. On trouve trois catégories principales de constructions : le piège à séquences régulatrices, le piège à promoteurs et le piège à gènes. Seule cette dernière catégorie, que nous avons utilisée dans notre étude, sera abordée ici.

La particularité du piège à gènes est qu'il possède, fusionné en 5' du gène rapporteur, un site accepteur d'épissage (*cf.* figure 36). Des travaux antérieurs ont montré que des sites donneurs et accepteurs d'origine différente pouvaient interagir fonctionnellement (Chu & Sharp, 1981). Ainsi, dans les cas où l'insertion s'effectue dans un intron, la présence du site accepteur d'épissage permet d'engendrer un transcrit de fusion comprenant une partie du gène endogène de longueur variable suivie du gène rapporteur.

L'organisation des premiers vecteurs plaçait le gène de sélection sous le contrôle indépendant d'un promoteur constitutivement actif dans les cellules ES (Skarnes *et al.*, 1992). Cela permettait de sélectionner positivement toutes les cellules ayant intégré la construction mais exigeait un second criblage pour repérer les événements fonctionnels. La création d'une construction composée d'un gène de fusion entre le gène de sélection et le gène rapporteur a rendu possible la sélection directe et exclusive des événements d'insertion fonctionnels : tout clone cellulaire sélectionné pour sa résistance à l'antibiotique est porteur d'une insertion dans un gène exprimé dans les cellules ES.

Finalement, cette stratégie possède trois avantages : *i)* le gène rapporteur *lacZ*, qui code la beta-galactosidase (dont l'activité est révélée par une coloration bleue en présence d'un substrat chromogène, le X-gal), permet de suivre le profil d'expression du gène dans

l'organisme génétiquement modifié ; ii) l'insertion de la construction est potentiellement mutagène en provoquant l'interruption de l'unité de transcription ; iii) la formation d'un transcrit de fusion entre la région 5' du messenger endogène et le gène rapporteur permet l'identification du gène « piégé » par l'utilisation de la technique 5' RACE PCR (*rapid amplification of cDNA ends*) (Frohman *et al.*, 1988).

La stratégie du *Gene Trap* est utilisée pour des approches d'inactivation systématique de tous les gènes de souris. Le désir de créer une banque publique de cellules ES murines mutées est à l'origine d'un consortium international de laboratoires investis dans cette tâche (<http://www.genetrap.org/>).

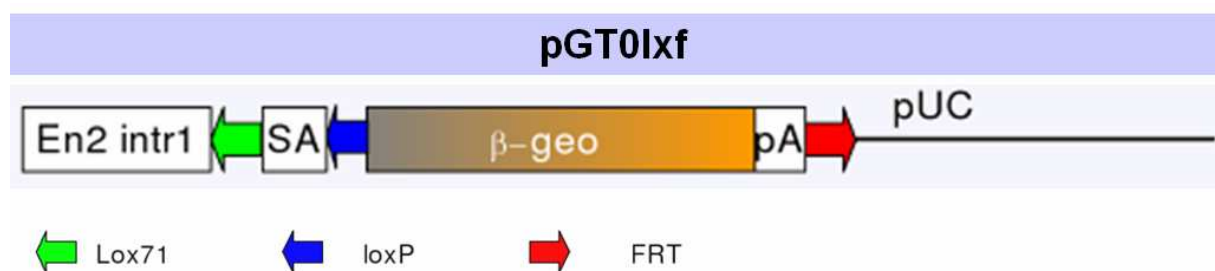


Figure 36. Type de construction utilisé. Exemple du vecteur pGT01xf du Sanger Institute. La construction beta-geo comprend un gène rapporteur, la beta-galactosidase (*LacZ*), fusionné à un gène de sélection, ici un gène de résistance à la néomycine (*neo*). Dans cette construction, l'expression du gène rapporteur dépend de l'intégration fonctionnelle à l'intérieur du gène cible. L'adjonction d'un site accepteur d'épissage en 5' de la construction permet l'expression du gène rapporteur même quand l'intégration a lieu dans un intron. Intron: 1.5 kb de l'intron 1 du gène En2 de souris ; SA : site accepteur d'épissage de l'exon 2 du gène En2 ; β-geo : fusion des gènes de la β-galactosidase et de la néomycine phosphotransférase ; pA : signal de polyadénylation de SV40. Les sites loxP et FRT permettent des modifications post-insertionnelles du locus piégé, qui ne seront pas évoquées ici.

D'après les ressources électroniques du Sanger Institute Gene Trap Resource (SIGTR) (<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/genetrap/vectors/>)

II RESULTATS

II.1 Profils d'expression des gènes de la famille *Agpat* dans les régions cérébrales

Afin de caractériser la distribution des membres de la famille *Agpat* dans le cerveau, nous avons recherché les séquences des tags dans nos différentes banques SAGE en utilisant les 10 pb consécutives au site de restriction de l'enzyme d'ancrage GATC le plus en 3' sur les séquences RefSeq des ADNc (*Agpat1* : NM_018862; *Agpat2* : NM_026212 ; *Agpat3* : NM_053014; *Agpat4* : NM_026644 ; *Agpat5* : NM_026792; *Agpat6* : NM_018743; *Agpat7* : NM_207206; *Agpat8* : NM_172715) (cf. table 8). *Agpat1*, *Agpat3*, *Agpat4* et *Agpat7* sont exprimés dans la quasi-totalité des régions cérébrales dont l'aire tegmentale ventrale. Cependant, seul *Agpat4* présente un enrichissement significatif dans l'ATV par rapport à 7 autres banques ($p < 0.01$ en simulation de Monte-Carlo), comme nous l'avons vu précédemment (cf. publication n°2). Les autres membres de la famille, *Agpat2*, *Agpat5*, *Agpat6* et *Agpat8* sont peu à pas exprimés dans les régions testées (abondance maximale pour *Agpat6* dans le noyau accumbens : $n = 2 / 80\,000$ tags). Ces résultats montrent que les gènes de la famille *Agpat* possèdent des profils d'expression chevauchants mais distincts dans le cerveau de souris.

Tag	WB	O	PrL	Cg	M	S	Ent	CPu	Acb	Th	SN	ATV	Gène
CCTGCCCCGTG	3	3	2	2	1	1	0	1	1	0	0	3	<i>Agpat1</i>
TACCCAGAGG	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	<i>Agpat2</i>
TGGCCCTTTT	1	3	0	1	2	0	1	2	1	1	2	3	<i>Agpat3</i>
CCCATGGAGG	5	1	1	1	2	0	1	0	0	4	5	7	<i>Agpat4</i>
TTACTTGTAT	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>Agpat5</i>
TGAGGATGTT	0	1	0	1	1	1	0	0	2	0	0	0	<i>Agpat6</i>
TGACCGGCTG	3	0	0	2	3	6	1	5	0	0	3	2	<i>Agpat7</i>
TATTTAATAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	<i>Agpat8</i>

Table 8. Abondance des tags des différentes *Agpat* dans les banques SAGE. WB : cerveau entier ; O : cortex orbitaire ; PrL : cortex prélimbique ; Cg : cortex cingulaire ; M : cortex moteur ; S : cortex somesthésique ; Ent : cortex entorhinal ; CPu : caudate-putamen ; Acb : noyau accumbens ; Th ; thalamus ; SN : substance noire ; ATV : aire tegmentale ventrale.

II.2 Génération de souris transgéniques hétérozygotes *Agpat4*^{+/-} par « piégeage » de gène.

Pour produire des souris déficientes *Agpat4*^{-/-}, nous avons utilisé une lignée de cellule souche embryonnaire porteuse d'une mutation insertionnelle dans *Agpat4* (SIGTR ; *Sanger Institute Gene Trap Resource* ; lignée CC0173). L'insertion est localisée à la jonction de l'exon1 et de l'intron1 d'*Agpat4* (qui contient 9 exons et 8 introns ; cf. figure 37a) et produit un transcrit de fusion contenant le premier exon d'*Agpat4* accolé à la construction beta-geo. La protéine attendue ne contient aucun acide aminé d'*Agpat4*, car l'exon1 n'est pas traduit. La mutation liée à l'insertion de la construction *gene trap* devrait donc aboutir à la délétion totale de la protéine endogène.

Nous avons tout d'abord confirmé par RT-PCR le site d'insertion de la construction *gene trap* dans un allèle d'*Agpat4* de la lignée CC0173. Après vérification du caryotype de la lignée, les cellules ES diploïdes *Agpat4*^{+/-}, ont été injectées dans des blastocytes de souris. Les mâles chimériques résultants ont été croisés avec des femelles C57BL/6N, et leur descendance génotypée par PCR afin d'identifier les individus hétérozygotes *Agpat4*^{+/-} (cf. figure 37b). Ces derniers doivent à présent être croisés entre eux pour générer des animaux homozygotes *Agpat4*^{-/-}.

II.3 Expression d'*Agpat4* au cours du développement embryonnaire

Afin d'explorer le profil d'expression d'*Agpat4* chez l'embryon, nous avons réalisé une coloration au X-gal des hétérozygotes au stade embryonnaire E11 (cf. figure 38a). La coloration bleue, liée à la métabolisation du X-gal par la beta-galactosidase, indique le lieu d'expression du gène rapporteur qui dépend du promoteur endogène d'*Agpat4*. L'expression du transgène est détectée dans les somites de l'embryon ainsi que dans le tegmentum qui est à l'origine du mésencéphale ventral, contenant notamment les groupes de cellules dopaminergiques A8, A9 et A10 (cf. figure 38b).

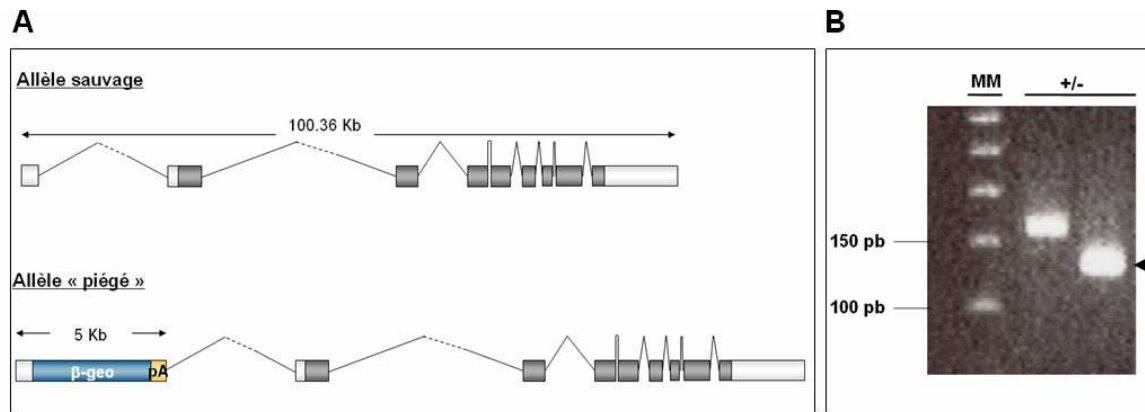


Figure 37. Organisation des allèles sauvage et « piégé » d'Agpat4. **A.** Les exons sont représentés par des rectangles. Les portions grisées indiquent la séquence codante d'Agpat4. La portion colorée en bleu, entre le premier exon et le premier intron de l'allèle « piégé », représente la construction beta-geo qui se termine par un signal de polyadénylation (en jaune). **B.** Génotype d'un hétérozygote obtenu par PCR. La flèche indique le fragment d'amplification correspondant à l'allèle « piégé ». MM : marqueur de masse moléculaire.

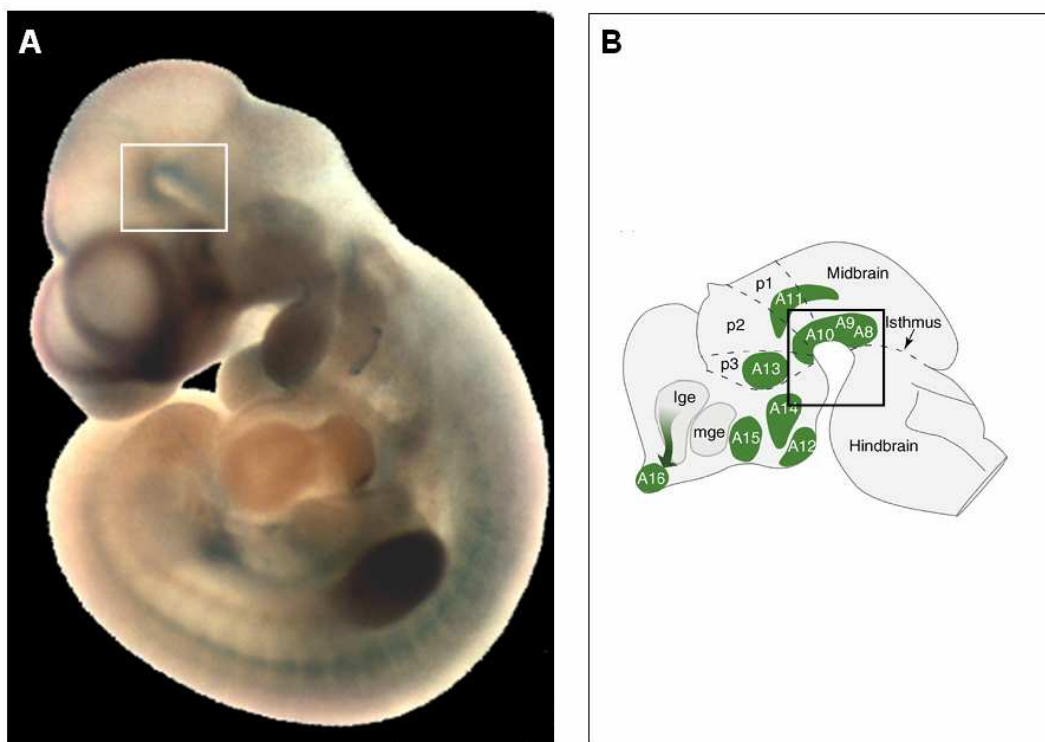


Figure 38. Expression d'Agpat4 chez l'embryon hétérozygote au stade E11. **A.** La coloration bleue indique l'expression de l'allèle « piégé », révélée par une coloration au X-gal de l'embryon entier. Le rectangle blanc encadre le tegmentum. Notez également la coloration des somites. **B.** Distribution des neurones dopaminergiques dans le cerveau murin au cours du développement. La numérotation des groupes de cellules, d'A8 à A16 est celle de Dalhström & Fuxe, 1964. Le rectangle noir encadre le tegmentum qui contient les aires A8, A9 et A10, correspondant respectivement à l'aire rétro-rubrale, la substance noire compacte et l'aire tegmentaire ventrale (D'après Björklund & Dunnett, in press).

III DISCUSSION

La famille des protéines AGPAT contient au moins huit membres, ce qui soulève la question de l'existence d'une redondance fonctionnelle. Une des approches pour répondre à cette question est la génération de souches de souris déficientes pour des AGPAT spécifiques. Ici, nous avons utilisé une lignée de cellule ES mutée offerte par une ressource *gene trap*, afin de générer des souris déficientes pour AGPAT4.

L'analyse, grâce à nos données SAGE, des profils d'expression des sept autres membres de la famille *Agpat* dans les différentes régions cérébrales, révèle que 4 transcrits (*Agpat1*, *Agpat3*, *Agpat4* et *Agpat7*) sont représentés dans le cerveau selon des patrons d'expression qui leur sont propres. L'expression cérébrale d'*Agpat1*, *Agpat3*, *Agpat4* et *Agpat7*, à l'exclusion des autres formes, est concordante avec les données de la littérature (Vergnes *et al.*, 2006). Par ailleurs, les études d'expression des *Agpat* dans les différents tissus murins, montrent toutes qu'*Agpat4* possède la distribution la plus spécifique de la famille, en n'étant détecté que dans le cerveau et dans l'intestin où son expression est moindre (Lu *et al.*, 2005; Vergnes *et al.*, 2006).

L'hybridation in situ a confirmé le profil d'expression très spécifique d'*Agpat4* dans le cerveau. Par ailleurs, la détection de l'expression du gène rapporteur *LacZ* dans les souris transgéniques hétérozygotes nous a permis de mettre en évidence que cette spécificité existait dès un stade précoce du développement, ce qui laisse supposer que la fonction d'*Agpat4* n'est pas redondante avec les autres membres de la famille. Par ailleurs, la régulation d'*Agpat4* dans un modèle de la maladie de Parkinson, ainsi que l'évidence du rôle joué par deux autres membres de la famille dans l'activation de voies de signalisation intracellulaires, laissent présager un rôle important d'*Agpat4* dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral. L'étude prochaine de souris homozygotes déficientes pour *Agpat4* devrait permettre d'en éclairer les fonctions.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Avec les progrès récents de la génomique fonctionnelle, de nouvelles techniques ont été appliquées à l'étude des différentes régions cérébrales dans le but d'établir leurs signatures moléculaires, dans différentes espèces, à différents stades du développement, dans les conditions normales et pathologiques.

Cependant, en raison du problème particulier de la complexité cérébrale, plusieurs régions, en particulier les plus petites, ont été ignorées par la plupart de ces études. Nous avons donc réalisé l'étude des transcriptomes de 11 régions cérébrales de souris, dont six régions corticales, le noyau accumbens, le striatum, le thalamus, la substance noire et l'aire tegmentale ventrale. Ces régions ont été choisies sur la base de leur implication fonctionnelle dans plusieurs pathologies du système nerveux, ou de la rareté des données concernant leur profil d'expression génique dans la littérature.

Pour chacune de ces régions, nous avons généré une banque d'expression en utilisant la méthode SAGE, en raison de ses avantages : *i)* elle est adaptable à de faibles quantités de tissu ; *ii)* elle permet d'explorer les transcriptomes sans informations de séquences *a priori* ; *iii)* elle génère des données d'expression quantitatives qui peuvent être comparées entre les différentes régions, et entre les différents transcrits.

Ce travail de thèse a tout d'abord contribué à la caractérisation d'un nouveau transcrit préférentiellement exprimé dans le striatum. En effet, une première étude des transcriptomes du cortex somatosensoriel, du striatum et du noyau accumbens par SAGE (de Chaldee *et al.*, 2003) avait permis de mettre en évidence le tag StM20, enrichi dans le striatum, qui ne correspondait à aucun ADNc dont la région codante soit complète. Nous avons dans un premier temps cloné l'ADNc correspondant à StM20 en criblant une banque d'ADNc de caudate-putamen de souris. En raison de son profil d'expression, nous avons appelé cette séquence *capucine*, pour *caudate-and putamen-enriched sequence*. L'étude fine de sa distribution par hybridation *in situ* a révélé que *capucine* était exprimé de façon prépondérante dans le striatum dorsolatéral qui reçoit les projections du cortex sensorimoteur. Son transcrit était également détectable dans les glomérules olfactifs, l'habenula médiane, et les noyaux antérodorsaux et paraventriculaires du thalamus. Nous avons également déterminé que *capucine* était une protéine transmembranaire, qui surexprimée en fusion avec l'EYFP, était localisée dans l'appareil de Golgi de deux lignées de cellules de mammifères. Afin

d'approcher la fonction de *capucine*, nous avons étudié son expression dans le contexte physiopathologique de la maladie de Huntington au cours de laquelle le striatum dégénère spécifiquement. Nous avons observé une répression significative de l'expression de *capucine* dans les deux modèles testés, ce qui laisse supposer son implication dans les mécanismes pathologiques de la MH.

La deuxième partie de ce travail de thèse a été dédiée à la mise en évidence de transcrits exprimés de façon régionalisée dans le cerveau de souris. En comparant les banques SAGE de 11 régions cérébrales, nous avons pu montrer l'expression différentielle de 308 transcrits. Certains d'entre eux sont des marqueurs régionaux connus (*e.g.* la tyrosine hydroxylase dans l'aire tegmentale ventrale), mais la plupart sont peu caractérisés, et 20 % n'ont pas d'annotation fonctionnelle.

Après validation de nos données SAGE par des expériences indépendantes de RT-PCR quantitative, et dans certains cas, d'hybridation *in situ*, nous avons étudié les profils d'expression de plusieurs dizaines de transcrits chez l'homme. Ceci nous a permis de montrer la conservation des patrons d'expression pour une trentaine d'ARNm entre les deux espèces.

Enfin, en postulant que l'expression régionalisée des transcrits était le reflet de leur importance fonctionnelle, nous avons étudié les conséquences d'un contexte pathologique sur leur expression. Nous avons ainsi pu mettre en évidence la répression de 14 transcrits préférentiellement exprimés dans le striatum, dans le modèle R6/2 de la maladie de Huntington. Il est également connu que la maladie de Huntington provoque des pertes neuronales dans le cortex ; l'étude de 15 transcrits corticaux dans le cortex des souris R6/2 a révélé la répression de 5 d'entre eux. Par ailleurs, nous avons étudié l'effet de la déafférentation dopaminergique du striatum dans le modèle MPTP murin de la maladie de Parkinson. Onze transcrits striataux étaient régulés dans cette condition 24 h ou 7 jours post-intoxication, dont 5 étaient déjà affectés dans le modèle R6/2. Cette observation suggère la mise en jeu de voies communes dans les modèles R6/2 et MPTP. Enfin, nous avons étudié un deuxième modèle de la maladie de Parkinson : le rat intoxiqué à la 6-OHDA. Nous avons mis en évidence l'induction de 5 transcrits dans le striatum du rat, et la répression de 9 transcrits dans la substance noire, 24 h ou 7 jours après l'injection. Les ARNm enrichis dans le striatum ne sont pas régulés de la même façon dans les deux modèles de la maladie de Parkinson, ce qui laisse penser que des mécanismes cellulaires distincts sont mis en jeu lors de la réponse à chacune des toxines.

Dans la troisième partie de cette thèse, nous avons évoqué les prémices de la caractérisation fonctionnelle d'*Agpat4*, dont, d'après nos travaux, l'ARNm est exprimé dans les cellules immuno-positives pour la tyrosine hydroxylase de la SNc et de l'ATV. L'inactivation du gène chez la souris est en cours. Nous avons d'ors et déjà généré des animaux hétérozygotes *Agpat4*^{+/-}. Une première étude de ces animaux a mis en évidence le profil d'expression spécifique d'*Agpat4* dans le mésencéphale, et ceci dès le stade embryonnaire E11. L'étude des animaux homozygotes devrait nous permettre de déterminer le rôle joué par *Agpat4* dans cette région du cerveau, en étudiant notamment la sensibilité au MPTP des souris KO par rapport aux souris sauvages.

L'ensemble du travail présenté dans ce mémoire ouvre la voie à plusieurs axes de recherche.

La caractérisation des transcrits

Elle comprend deux principales composantes : l'exploitation des données d'expression que nous n'avons pas encore analysées dans les banques, et l'étude fine du profil d'expression des transcrits présélectionnés (*cf.* publication n°2), notamment l'identification du type cellulaire dans lequel les marqueurs sont exprimés.

Etude approfondie des banques SAGE

SAGE fournit des données très denses qui peuvent être exploitées de nombreuses façons. La possibilité de modifier à loisir les critères de comparaison des banques nous offre l'opportunité de réaliser un grand nombre d'études. Il serait notamment intéressant d'étudier les transcrits moins abondants que ceux retenus par nos critères, car ce sont aussi les moins bien caractérisés. Par ailleurs, lors de notre analyse, nous avons mis en évidence dans les banques un grand nombre de tags « antisens » (*cf.* table 9), c'est-à-dire dont la séquence correspond aux 10 ou 15 pb en 3' du site GATC de l'enzyme d'ancrage sur le brin complémentaire. Il est peu probable que leur origine soit un artéfact, d'autant plus qu'il est désormais admis qu'un grand nombre de gènes de mammifères possède des transcrits antisens (Katayama *et al.*, 2005). De plus, ils seraient particulièrement nombreux dans le système nerveux, et leur action régulatrice commence tout juste à être appréhendée (Korneev & O'Shea, 2005). Ces ARN antisens possèdent des profils d'expression spatiotemporels spécifiques, et modulent l'expression des gènes impliqués dans des processus aussi variés que la morphogenèse cérébrale, la prolifération des cellules souches, la réponse au stress, la

polarité cellulaire, les fonctions cytosquelettiques, la survie neuronale, la maturation et la plasticité synaptique (Korneev & O'Shea, 2005). L'étude de ces transcrits antisens, apparaît donc cruciale dans la compréhension des fonctions cérébrales.

Séquence du tag	WB	O	PrL	Cg	M	S	Ent	Cpu	Acb	Th	SN	ATV	Identification
TGACCATTCC	19	2	2	1	1	1	3	1	8	7	46	24	Antisens de Sparc secreted acidic cysteine rich glycoprotein
CTGTCTGCAG	3	1	4	1	1	2	0	0	0	1	8	6	Antisens de Sparcl1 SPARC-like 1 (mast9, hevin)
CACTTTTATT	3	0	1	0	1	1	0	0	0	0	7	4	Antisens de Scd1 stearoyl-Coenzyme A desaturase 1
TAGAAGGCAC	3	2	0	4	5	0	1	0	1	0	7	8	Antisens de Bcat1 branched chain aminotransferase 1, cytosolic
TTACAAATTT	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	3	11	Antisens de Ret ret proto-oncogene
TTCTGTGCCAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	10	Antisens de Slc6a3 solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3

Table 9. Tags « antisens » enrichis dans la substance noire et l'aire tegmentale ventrale.

Par ailleurs, il existe nombre d'ARN « sens » non codants polyadénylés transcrits sur le génome des mammifères (Carninci *et al.*, 2005). Une partie de ces ARN a été récemment classée en tant que macroARN, ou longue région non-codante exprimée chez la souris (ENOR) (Furuno *et al.*, 2006). Certains loci ENOR produisent plusieurs macroARN, tous enrichis dans le cerveau.

Définition du type cellulaire dans lequel les transcrits sont exprimés

En raison de la très grande hétérogénéité cellulaire du cerveau, l'identification du type cellulaire dans lequel les marqueurs sont exprimés apparaît critique pour définir leur rôle fonctionnel. Cette question a été abordée au cours de ce travail pour des marqueurs du mésencéphale par hybridation *in situ* combinée à l'immunohistochimie. Cette approche pourrait être étendue à d'autres régions, et d'autres techniques pourraient être développées, comme la double hybridation *in situ* combinant marquage isotopique et non-isotopique. Il serait alors possible de colocaliser l'expression de nouveaux marqueurs avec celle de marqueurs connus. Par exemple, dans le striatum, trois types de cellules pourraient être étudiés : les astrocytes caractérisés par la présence du transporteur de glutamate GLAST (Schmitt *et al.*, 1997), les neurones épineux de taille moyenne projetant sur le globus pallidus

et exprimant l'enképhaline, et les neurones épineux de taille moyenne projetant sur la substance noire et le noyau entopédonculaire, qui expriment la substance P.

Du transcrit à la protéine

Une des limites principales des approches transcriptomiques est qu'une grande partie des fonctions cellulaires est assurée au niveau traductionnel ou post-traductionnel (Anderson & Seilhamer, 1997). Il est donc nécessaire de poursuivre notre travail par une étude des protéines, ce qui requiert la génération d'anticorps dirigés contre les protéines codées par nos marqueurs. Tout d'abord, il est important d'explorer la distribution des protéines dans le cerveau, pour des raisons inhérentes à la structure même du neurone ; il est en effet possible qu'un gène transcrit dans le noyau code une protéine destinée à la synapse. C'est par exemple le cas de *Rasgrp2* (RAS, guanyl releasing protein 2) (Kawasaki *et al.*, 1998), dont l'ARNm est enrichi dans le striatum mais dont la protéine est plus abondante dans les terminaisons des projections striatales vers la substance noire et le globus pallidus (*cf.* figure 39). Ensuite, des anticorps permettent de déterminer la localisation subcellulaire des protéines et constituent un outil essentiel des analyses fonctionnelles, en offrant par exemple la possibilité de contrôler l'inactivation d'un gène au niveau protéique, ou encore pour suivre d'éventuelles modifications post-traductionnelles.

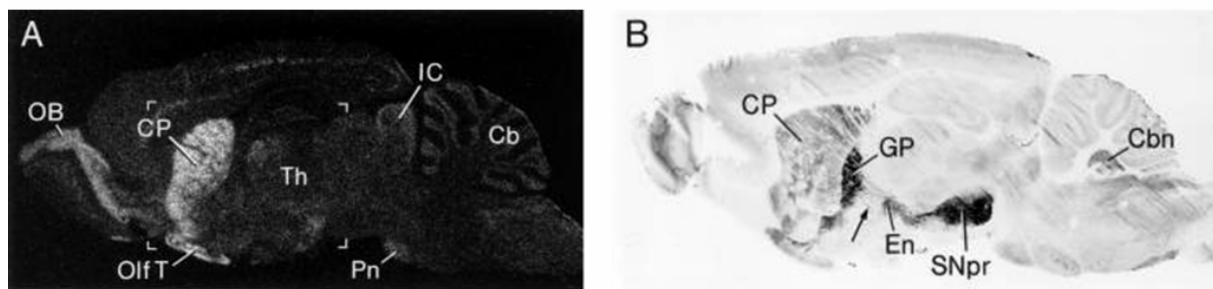


Figure 39. Distribution différentielle de l'ARNm et de la protéine de *Rasgrp2* dans le cerveau de rat. **A.** Hybridation *in situ* isotopique sur une coupe sagittale du cerveau de rat, montrant une localisation prédominante de l'ARNm de *Rasgrp2* dans le striatum et le bulbe olfactif, avec un signal plus faible dans les autres régions. **B.** Marquage immunohistochimique de RASGRP2 sur une coupe sagittale montrant le marquage du striatum et des projections striatales, et le marquage intense du globus pallidus et de la substance noire, avec également un marquage du bulbe olfactif et du tronc. La flèche désigne le marquage des projections striatales. Cb : cervelet ; Cbn : noyau cérébelleux ; CP : caudate-putamen ; En : noyau entopédonculaire ; GP : globus pallidus ; IC : colliculus inférieur ; OB : bulbe olfactif ; Olf T : tubercule olfactif ; Pn : noyaux pédiculopontins ; SNpr : substantia nigra pars reticulata ; Th : thalamus.

D'après Kawasaki et al., 1998.

Etudes fonctionnelles

De nombreuses approches sont possibles pour caractériser la fonction d'un gène ou d'une protéine. Une approche « classique » est d'éteindre l'expression du gène, à l'échelle de l'organisme entier ou de la cellule en culture. Ainsi, nous avons déjà entrepris l'inactivation d'*Apat4* chez la souris. Cependant, cette procédure très longue est difficilement envisageable à grande échelle. Aussi, l'étude de l'inactivation ou la surexpression des gènes candidats dans des neurones en culture paraît-elle une alternative intéressante. L'approche pourrait consister d'une part à développer des cultures neuronales exprimant nos marqueurs, et d'autre part à mettre en place une stratégie d'ARNsi et des vecteurs de surexpression, pour éteindre ou surexprimer les gènes candidats. Les effets de l'inactivation/surexpression des gènes pourraient être déterminés en étudiant la morphologie des cellules (*e.g.* influence sur l'élongation des neurites en présence d'un facteur de croissance), la survie (*e.g.* influence de l'élimination du sérum dans le milieu de culture, ou d'une irradiation), ou encore la signalisation intracellulaire (*e.g.* influence sur l'état d'activation des protéines impliquées dans différentes voies de signalisation).

La maladie de Huntington

Les mécanismes sous-jacents à la vulnérabilité préférentielle du striatum dans la MH ne sont pas connus. On peut néanmoins envisager l'influence d'un ou plusieurs facteurs régionaux sur la survie des cellules exprimant la huntingtine mutante. Par exemple, des niveaux importants de dopamine et la machinerie moléculaire liée à celle-ci, dont les récepteurs D2, pourraient jouer un rôle majeur dans la vulnérabilité striatale (Charvin et al., 2005). Il est donc hautement probable que d'autres protéines préférentiellement exprimées dans le striatum puissent être impliquées dans sa vulnérabilité. L'analyse des effets de l'inactivation ou de la surexpression des marqueurs striataux issus de notre étude sur la sensibilité des cellules striatales à la huntingtine mutée pourrait permettre d'identifier de nouveaux mécanismes ou facteurs impliqués dans le processus pathologique de la MH. Deux modèles sont notamment envisageables pour réaliser cette étude : un modèle cellulaire de cultures neuronales infectées par un lentivirus (Zala *et al.*, 2005), et un modèle utilisant les vecteurs lentiviraux chez le rat (de Almeida *et al.*, 2002). Ce dernier modèle a déjà été employé avec succès pour déterminer le rôle de différentes protéines dans la MH (Pardo *et al.*, 2006). L'approche consisterait à injecter dans le striatum du rat un mélange de vecteurs codant la huntingtine mutée, et de vecteurs dédiés à l'inactivation ou la surexpression des gènes candidats. L'injection d'un troisième type de vecteur, codant la GFP (Green

Fluorescent Protein), pourrait permettre de mesurer la survie des cellules, potentiellement réduite ou prolongée par l'inactivation ou la surexpression du gène candidat. Ceci pourrait avoir deux conséquences directes : le développement de nouveaux marqueurs diagnostiques et l'identification de possibles cibles thérapeutiques.

I DISSECTION DES REGIONS CEREBRALES

Après anesthésie au pentobarbital sodique (180 µg/g de masse corporelle), les souris mâles C57BL/6 de 10 à 12 semaines sont décapitées. Le cerveau prélevé est immédiatement rincé dans du PBS 1X et disposé dans une matrice pour jeunes rats placée sur un lit de glace, dans laquelle il est segmenté transversalement en coupes d'une épaisseur de 1 mm (*cf.* figure 40a). Pour les régions de petite taille, des tranches de 3 mm sont réalisées dans la matrice (*cf.* figure 40b). Ces sections sont ensuite découpées plus finement au Vibratome (Oxford®) en tranches de 300 µm d'épaisseur.

Toutes les régions sont disséquées au scalpel sous loupe binoculaire (Zeiss®), à l'exception de l'aire tegmentale ventrale qui est prélevée à l'aide d'un punch de 0,53 mm de diamètre (Stoelting). Les frontières des différentes régions (*cf.* figure 41) sont estimées en se référant à l'Atlas de Paxinos et Franklin (Paxinos, 2001).

Les prélèvements d'une même région cérébrale sont rassemblés et broyés dans un homogénéisateur de Dounce contenant une solution dénaturante pour l'extraction des ARN totaux (Chomczynski & Sacchi, 1987). Pour générer les banques SAGE, la solution dénaturante est accompagnée d'un tampon de lyse et d'hybridation (Dynabeads mRNA kit, Dynal®) afin d'extraire des ARNm polyadénylés. Les lysats sont conservés à -80°C.

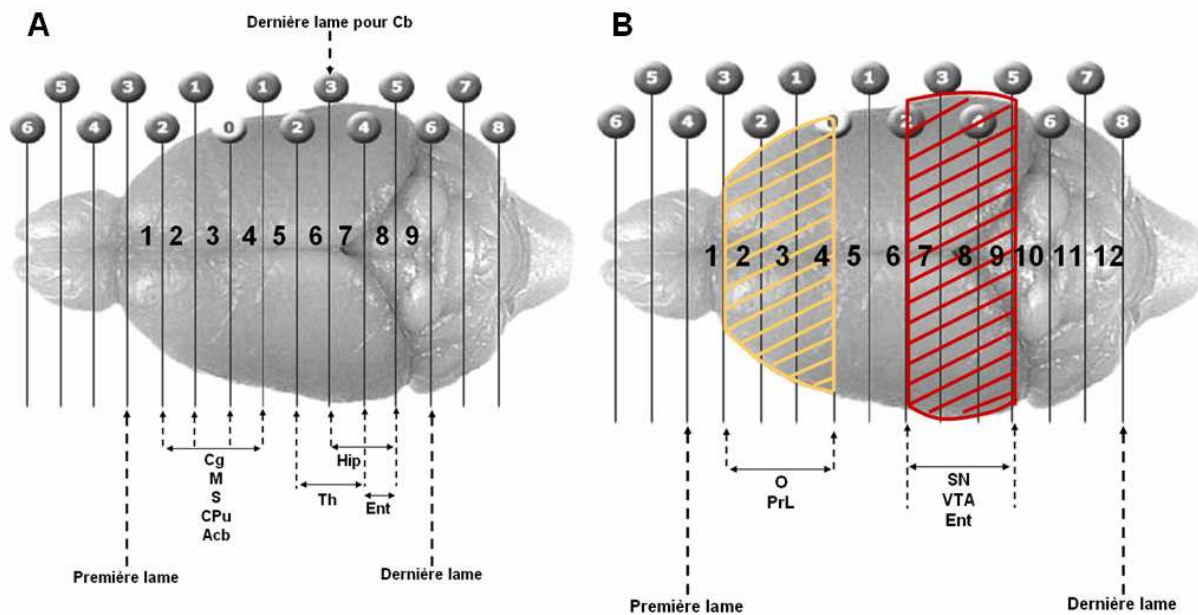


Figure 40. Position des lames dans la matrice pour la dissection des régions cérébrales.
A. Position des coupes sur lesquelles sont réalisées les dissections des cortex cingulaire (Cg), moteur (M), somesthésique (S) et entorhinal (Ent), du caudé-putamen (CPu), du noyau accumbens (Acb) et du thalamus (Th). Les coupes sur lesquelles sont prélevés l'hippocampe (Hip) et le cervelet (Cb), utilisés lors des expériences de qRT-PCR, sont également indiquées.
B. Positions des coupes de 3 mm qui seront tranchées plus finement au vibratome en section de 300 µm pour la dissection des régions suivantes : Cortex orbitaire (O), prélimbique (PrL) et entorhinal (Ent), substance noire (SN) et aire tegmentale ventrale (ATV).

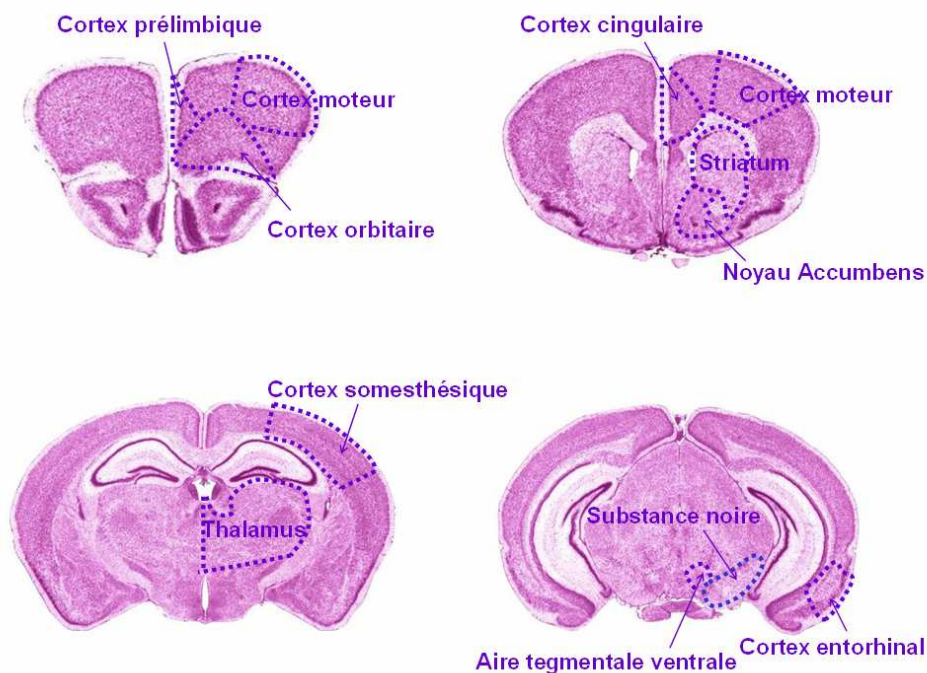


Figure 41. Représentation des régions disséquées pour la génération des banques SAGE et la qRT-PCR.

II GENERATION DE LA BANQUE LONGSADE DE SUBSTANCE NOIRE

II.1 Purification des ARNm.

Le lysat tissulaire est obtenu frais ou conservé à -80°C dans 700 μl de tampon de lyse et d'hybridation (Dyna^l®). La purification est réalisée par affinité : les extrémités polyadénylées des ARNm sont hybridées sur des oligo(dT) liés de façon covalente à des billes magnétiques (Dynabeads® (dT)₂₅). L'étape de fixation des ARNm aux billes est suivie d'une série de huit lavages. La totalité des ARNm fixés aux billes est destinée à la synthèse d'ADNc.

Protocole 1 : Purification des ARNm

Equipements et réactifs :

- Tissu d'intérêt
- Kit Dynabead mRNA direct (Dyna^l, ref 610-11) contenant les billes magnétiques oligo (dT)₂₅, le tampon de lyse et les tampons de lavage
- Portoir aimanté pour concentrer les billes
- Tampon pour reverse transcription (RT) 5X (Tris-HCl 250mM (pH 8.3), KCl 375mM, MgCl₂ 15mM) fourni avec le kit de synthèse de l'ADNc (cf protocole 2)
- Glycogène pour biologie moléculaire

Méthode :

1. Effectuer la lyse de l'échantillon de tissu dans 700 μl de tampon de lyse et d'hybridation avec 60 μg de glycogène.
2. Introduire 60 μl de billes magnétiques dans un tube de 1.5ml.
3. En utilisant le portoir magnétique, éliminer le surnageant et ajouter le lysat tissulaire (700 μl). Vortexer et incuber 10min à température ambiante pour permettre l'hybridation des ARNm sur les oligos(dT).
4. Placer le tube sur le portoir magnétique, éliminer le surnageant et effectuer les lavages suivants : 2 fois avec 500 μl de tampon de lavage contenant du lithium dodecyl sulphate (LiDs), 3 fois avec 400 μl de tampon de lavage puis 2 fois avec 200 μl de tampon RT 1X. Transférer dans un tube propre et rincer 1 fois avec 200 μl de tampon RT 1X. Eliminer complètement le tampon et passer immédiatement au Protocole 2.

II.2 Synthèse de l'ADNc et clivage par l'enzyme d'ancrage *Sau3AI*.

Le premier brin d'ADNc est synthétisé en utilisant pour amorce l'oligo(dT) fixé sur les billes magnétiques. Pour cette étape, il est recommandé d'utiliser l'enzyme Superscript II M-MLV RT (Virlon *et al.*, 1999). La réaction de synthèse du second brin est réalisée en présence de [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (6000 Ci/mmol) ce qui permet de mesurer la quantité d'ADNc

générée. La synthèse des ADNc est suivie de sept lavages. A chaque lavage, la quantité de radioactivité non incorporée diminue dans les surnageants. En revanche, l'ADNc fixé aux billes est radioactif.

L'ADNc obtenu est clivé par l'enzyme de restriction *Sau3AI* qui coupe au motif GATC. Après digestion, le surnageant est prélevé et les billes sont lavées puis séparées en deux aliquotes. Le surnageant est conservé pour calculer la quantité d'ADNc 5' qu'il contient.

Protocole 2 : synthèse et coupure de l'ADNc

Equipement et réactifs :

- Kit de synthèse d'ADNc (Invitrogen réf 1827-013) contenant tous les tampons et enzymes nécessaires pour la synthèse du premier et second brin d'ADNc
- [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP à 6000 Ci.mmol⁻¹
- TEN (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 1 M NaCl)
- Endonucléase de restriction *Sau3AI* 4 U. μl^{-1} (New England Biolabs, ref 169L) fourni avec du tampon de réaction 10X et de la BSA purifiée 100X (10 mg.ml⁻¹)
- Bains à 42°C, 37°C et 16°C
- Compteur Geiger

Méthode:

1. Resuspendre les billes dans 10 μl de tampon de réaction RT 1X, incubé 2 min à 42°C.
2. Placer le tube 1 min à 37°C. Ajouter 10 μl du mélange suivant : 4,7 μl d'eau traitée au DEPC, 2,5 μl de tampon RT 5X, 1,25 μl de dNTP 10mM, 2,5 μl de DTT 100mM, 1,55 μl de reverse transcriptase MMLV.
3. Incuber 1 h à 37°C et mettre sur glace.
4. Préparer le mélange suivant sur glace : 98,3 μl d'eau-DEPC, 3,3 μl de dNTP 10mM, 33 μl de tampon de réaction second brin, 3 μl d' [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP, 4,4 μl de *E.Coli* DNA polymérase I, 1,1 μl de *E.Coli* RNase H, 1,1 μl de *E.Coli* DNA ligase, 1 μl de glycogène 5 $\mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$.
5. Ajouter 138 μl du mélange au tube et incubé à 16°C sur une nuit. Conserver le reste du mélange pour mesurer sa radioactivité et calculer l'activité spécifique du dCTP.
6. Laver les billes pour éliminer l' [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP non incorporé : 4 fois avec 200 μl de TEN + BSA (0,1mg.ml⁻¹ final), 3 fois avec 200 μl de mix *Sau3AI* 1X + BSA (0,1mg.ml⁻¹ final). Vérifier au compteur Geiger que le dernier éluat n'est plus radioactif, contrairement au matériel lié aux billes.
7. Ajouter sur les billes le mélange suivant : 88 μl d'H₂O, 10 μl de mix *Sau3AI* 10X, 1 μl de BSA 100X, 2 μl de *Sau3AI*. Incuber 2 h à 37°C en vortexant régulièrement.
8. Placer 5 min sur glace.
9. A l'aide du portoir aimanté, ôter le surnageant qui contient les extrémités 5' des ADNc. Laver avec 200 μl de mix *Sau3AI* 1X + BSA à 0,1mg.ml⁻¹ final. Pooler le surnageant avec le premier, et conserver pour mesurer le rendement de la synthèse du second brin.
10. Resuspendre les billes dans 200 μl de TEN + BSA (0,1mg.ml⁻¹ final).

II.3 Quantification des ADNc synthétisés.

La quantité de second brin d'ADNc formée est calculée en utilisant l' [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP comme traceur radioactif. Plus précisément, la quantité totale d'ADNc formée est estimée en

mesurant la radioactivité incorporée dans les extrémités 5' (libérées dans le surnageant après digestion par *Sau3AI*).

La quantité d'ADNc contenue dans le surnageant est calculée selon l'équation :

$$\frac{\text{Activité incorporée (cpm)} \times 4 \text{ (pmol dNTP/pmol dCTP)} \times 2}{\text{Activité spécifique du dCTP* (cpm/pmol)} \times 3030 \text{ (pmol dNTP/}\mu\text{g)}}$$

- Activité incorporée = activité incorporée dans l'ADNc libre (5') obtenu après digestion *Sau3AI*.
- Activité spécifique = activité introduite dans la réaction de synthèse du second brin divisée par la quantité de dCTP froid dans le même volume.
- Facteur 4 => pour chaque dCTP* compté, 4 nucléotides en moyenne sont incorporés dans l'ADNc.
- Facteur 3030 => pour la conversion de pmol en μg .
- Facteur 2 => pour déterminer la quantité d'ADN double brin.

II.4 Liaison des adaptateurs.

La quantité d'adaptateurs introduite dans chaque fraction aliquote est indiquée en table 10. Elle est dépendante de la quantité d'ADNc utilisée pour générer la banque.

Afin de favoriser leur ligature cohésive avec les extrémités libres des ADNc, les adaptateurs ont subi deux modifications chimiques : une phosphorylation en 5' et l'ajout d'un squelette carboné (C7) en 3'. Les séquences complètes des adaptateurs sont indiquées en figure 42.

Les sept lavages effectués sur les billes après ligature ont pour but d'éliminer l'excès d'adaptateurs qui ne sont pas liés aux ADNc. La contamination de la banque par les séquences d'adaptateurs, et donc la rapidité d'acquisition des données dépend de la qualité des lavages réalisés à cette étape du protocole. En effet, à la suite des amplifications PCR, une quantité même infime d'adaptateurs libres sera amplifiée de façon très significative.

Quantité d'ADNc total	Quantité d'adaptateurs
0,134 µg	0,4 pmol

Table 10. Quantité d'ADNc total calculée, et quantité d'adaptateurs utilisée en conséquence.

<p>Adaptateur A : 5' GCCAGGTCACCTCAAGTCGGTCATTCATGTCAGCACAGGTCCGAC 3' 3' amineC7 – CGGTCCAGTGAGTTCAGCCAGTAAGTACAGTCGTGTCCAGGCTGCTAG – P 5'</p> <p>Adaptateur B : 5' TGCTCAGGCTCAAGGCTCGTCTAATCACAGTCTAAGGTCCGAC 3' 3' amineC7 – AGCAGTCCGAGTTCAGGACGAGATTAGTGTCTAGATTCCAGGCTGCTAG – P 5'</p>
--

Figure 42. Séquences des adaptateurs A et B pour le protocole LongSADE. En vert : le site de reconnaissance de l'enzyme d'étiquetage *MmeI*. En rouge : la séquence complémentaire au site de restriction de l'enzyme d'ancrage *Sau3AI*. Les extrémités cohésives des adaptateurs sont phosphorylées en 5', et un squelette carboné C7 est ajouté en 3'.

Protocole 3 : ligature des adaptateurs aux ADNc

Equipements et réactifs :

- Adaptateurs A et B à 0.5pmol.µl⁻¹
- TEN, TE, loTE (3mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2mM EDTA)
- Tampon New England Biolabs 4 10X et BSA 100X
- T4 DNA ligase 5U.µl⁻¹(Invitrogen, ref 15224-041), mix ligase 5X, ATP 10mM
- Bains à 45°C et 16°C

Méthode :

1. A l'issue du Protocole 2, laver les billes 2 fois avec 200µl de TEN + BSA (0,1mg.ml⁻¹ final), puis les resuspendre dans 200µl du même tampon. Séparer les billes en deux aliquotes de 100µl : la première sera liguée à l'adaptateur A (fraction A) et la seconde à l'adaptateur B (fraction B).
2. Laver 3 fois chaque tube avec 200µl de TE + BSA (0,1mg.ml⁻¹ final) glacé. Réduire progressivement le volume à 20µl.
3. Enlever la totalité du TE + BSA et ajouter immédiatement dans chaque tube 0.4pmol de l'adaptateur approprié (volume final = 13µl) puis 4µl de mix ligase 5X. Incuber 5min à 45°C puis 15min à température ambiante. Transférer les tubes sur glace.
4. Ajouter dans chaque tube 2µl d'ATP 10mM et 1µl de T4 DNA ligase. Incuber la nuit à 16°C.
5. Laver les billes 4 fois avec 200µl de TEN + BSA (0,1mg.ml⁻¹ final), éliminer la moitié du surnageant (100µl), resuspendre soigneusement les billes et pooler les fractions A et B dans un tube propre. Laver 3 fois avec 200µl NEB 4 1X + BSA (0,1mg.ml⁻¹ final). Lors du dernier lavage, réduire progressivement le volume (200, 150, 100, puis 50µl).
6. Passer immédiatement au Protocole 4 ou conserver à 4°C.

II.5 Clivage par l'enzyme d'étiquetage *MmeI* et formation des ditags.

Après digestion par *MmeI*, les tags d'ADNc (15 pb) liés aux adaptateurs (45 pb) sont libérés. La plus grande partie des ADNc reste donc associée aux billes. La radioactivité incorporée dans la fraction 3' des ADNc peut être mesurée directement sur les billes par comptage Cerenkov, ce qui permet d'estimer la quantité de matériel perdue au cours des lavages.

La ligation des tags est réalisée directement sur leur extrémité cohésive. En effet, les extrémités obtenues après clivage par *MmeI* sont débordantes en 3' (figure 43). Il serait envisageable d'obtenir des bouts francs en faisant agir une exonucléase. Cependant, le raccourcissement des tags provoquerait une perte d'information, alors qu'un des objectifs de la méthode LongSADE est précisément d'augmenter la longueur des tags.

Les deux fractions aliquotes de tags liés aux adaptateurs sont mélangées et mises en condition de ligation en présence de l'enzyme T4 DNA ligase.

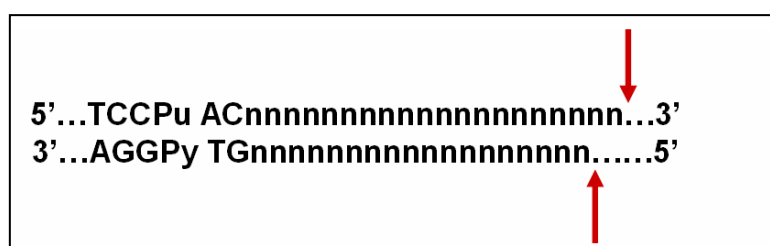


Figure 43. Sites de restriction de l'enzyme *MmeI*.

Protocole 4 : formation des ditags

Equipements et réactifs :

- *MmeI* (2U. μl^{-1}), SAM (s-adenosyl méthionine, cofacteur) 0.5mM, tampon NEB 4 10X, BSA 100X
- Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol (PCI)
- Acétate d'ammonium 10M
- T4 DNA ligase (5U. μl^{-1}). Tampon de ligation 5X
- Ethanol 100% et 75%
- Bains à 37°C et 16°C

Méthode :

1. Eliminer le surnageant et ajouter 100µl du mélange suivant sur les billes : 79,5µl d'H₂O, 1 µl de NEB 4 10X, 10µl de SAM 0.5mM, 0.5µl de *MmeI* à 2U.µl⁻¹. Incuber 2h à 37°C.
2. Récupérer le surnageant dans un tube 1,5ml propre et rincer deux fois avec 75µl de TE + BSA à 0,1mg.ml⁻¹ final. Rassembler les surnageants (250µl au final).
3. Resuspendre les billes dans 20µl d'H₂O et transférer le tube de billes dans une fiole de comptage. Effectuer un comptage Cerenkov.
4. Ajouter 250µl de PCI et 60µg de glycogène aux surnageants. Vortexer vigoureusement puis centrifuger 10min à 12.000 g, 4°C. Transférer la phase aqueuse dans un tube propre.
5. Ajouter à la phase aqueuse 125µl d'acétate d'ammonium 10M, puis 1175µl d'éthanol 100% (High Ethanol concentration, condition de précipitation spécifique aux ditags). Centrifuger 20min à 15 000g, 4°C.
6. Rincer le culot deux fois avec 400µl d'éthanol 75% glacé. Sécher le culot sous vide et resuspendre dans 6µl de LoTE (Tris 3mM, EDTA 0,2mM).
7. Ligaturer les tags pour former les ditags en ajoutant 2 µl de mix ligase 5X, 1µl ATP 10mM, 1µl T4 DNA ligase (5U.µl⁻¹). Incuber une nuit à 16°C puis ajouter 90µl LoTE.

II.6 Amplification PCR.

Deux séries d'amplification sont réalisées. La première série de PCR (figure 44) permet de déterminer le nombre optimal de cycles d'amplification : différents nombres de cycles sont testés sur une petite partie (2 %) du produit de ligature. Le nombre de cycles choisi dépend évidemment de la quantité de matériel de départ.

La forme moléculaire majoritaire a une taille en accord avec celle du produit d'amplification attendu (132 pb). A 27 cycles, le fragment de 132 pb est enrichi comparativement aux produits d'amplification non spécifiques, qui ne correspondent pas aux ditags.

Après 27 cycles d'amplification à grande échelle (50 répliques), la construction moléculaire complète (102 pb d'adaptateurs et 30 pb de ditag) est purifiée sur gel d'agarose 3% (figure 45), puis soumise à une deuxième série d'amplification de 10 cycles, nombre de cycles optimal préalablement déterminé (figure 46). 270 réactions de PCR sont ainsi réalisées sur l'ADN purifié sur gel d'agarose.

Après amplification, l'ADN issu de cette PCR préparatoire est fractionné sur un gel de polyacrylamide 12% (figure 47).

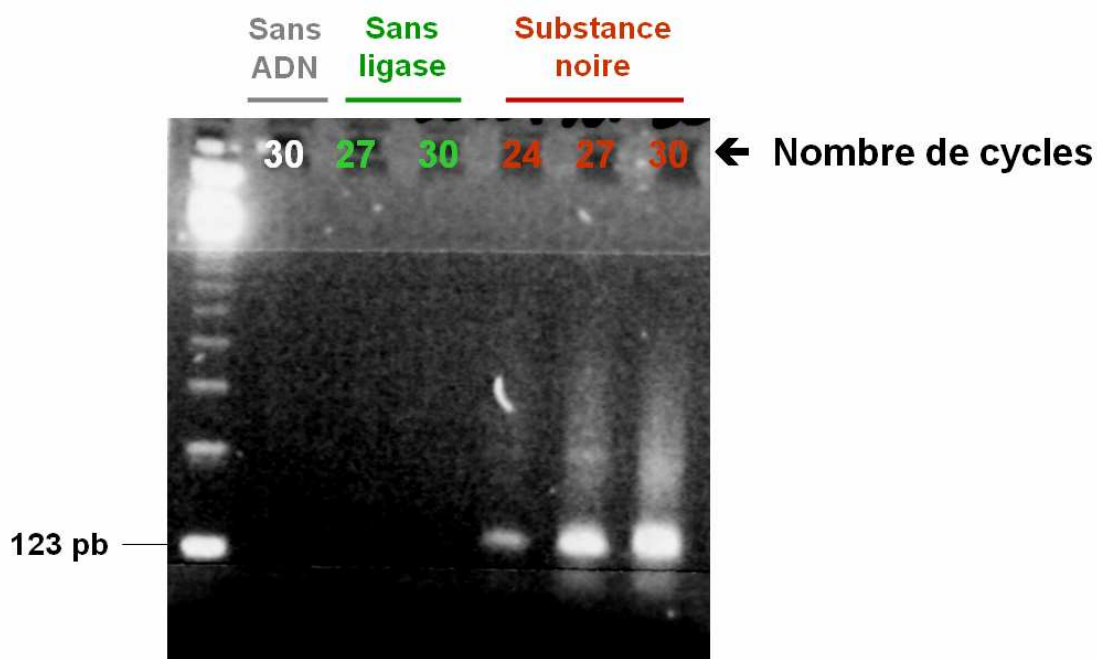


Figure 44. Détermination du nombre optimal de cycle pour l'amplification des ditags. Après ligation, 24 à 30 cycles de PCR sont effectués pour amplifier les ditags générés à partir de la substance noire. Pour chaque cycle, 8% du produit d'amplification sont déposés sur gel d'agarose 3%. La migration du marqueur de taille (ADN 123 pb, Invitrogen) est indiquée à gauche.

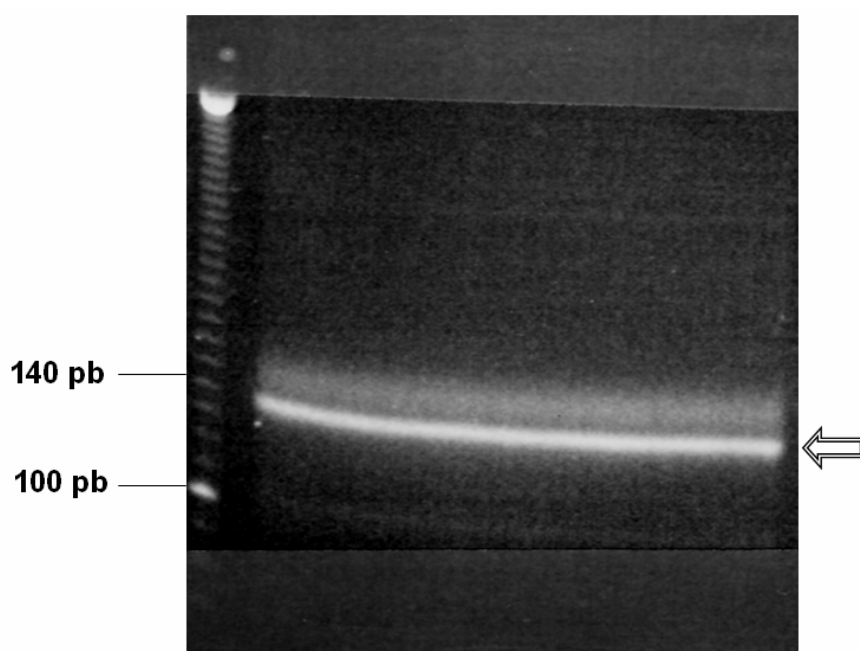


Figure 45: Purification du fragment d'intérêt de 132 pb sur un gel préparatif. Les contenus d'une dizaine de tubes de PCR sont rassemblés et déposés sur gel (agarose 3% à bas point de fusion). Le gel est révélé sous UV après coloration au bromure d'éthidium. La flèche indique la position de la bande découpée. La migration du marqueur de taille (ADN 10 pb, Invitrogen) est indiquée à gauche.

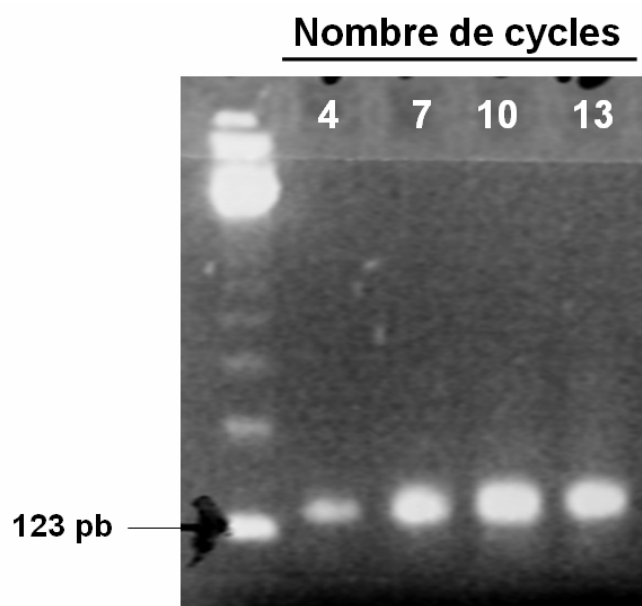


Figure 46. Détermination du nombre optimal de cycles pour la réamplification des ditags. Cinétique de réamplification des ditags à 4, 7, 10 et 13 cycles de PCR. Des fractions aliquotes (8%) des produits d'amplification sont analysées sur gel d'agarose 3% coloré au bromure d'éthidium. Le produit attendu (adaptateur + ditag) fait 132 pb.

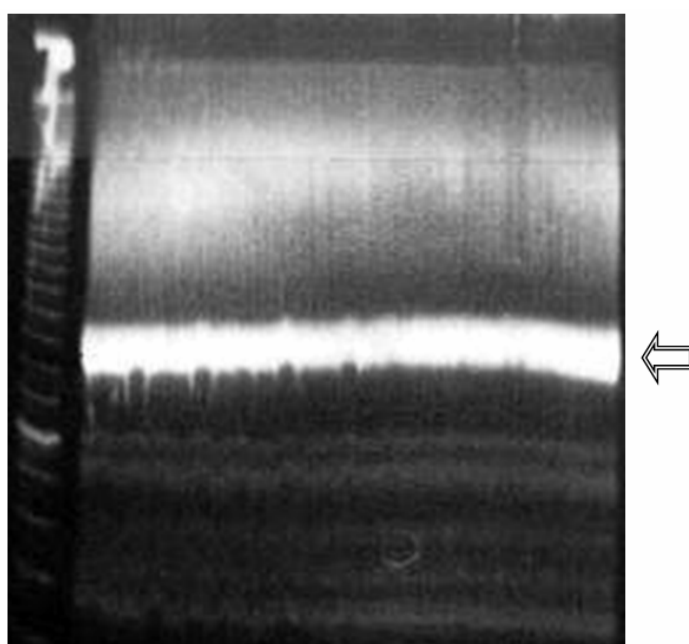


Figure 47. Purification du fragment d'intérêt de 132 pb issu de la deuxième série de PCR. Les produits PCR sont mis en migration dans un gel de polyacrylamide 12%. Le gel est révélé sous UV après coloration au SYBR Green I. La flèche indique la position de la bande découpée.

Protocole 5 : amplification des ditags par PCR

Equipements et réactifs :

- Thermocycleur (Hybaid ®)
- Réactifs de PCR : Taq polymérase (Promega), amorces à 20pmol.µl⁻¹, tampon PCR 10X (Promega), 1.25mM dNTP, 25mM MgCl₂
- β-Agarase et tampon de réaction 10X (New England Biolabs, ref 392L)
- Tampon de réaction *Sau3AI* et BSA 100X
- Agarose à bas point de fusion (Invitrogen ref 15517-022)
- TBE 10X (1.12M Tris, 1.12M acide borique, 20mM EDTA)
- Matériel pour électrophorèse sur gel vertical (plaques 20 x 20cm, espaceur 1.5mm et peigne préparatif)
- Marqueur de taille 10bp
- Tampon de charge au bleu de bromophénol (bleu de bromophénol 0.125%, Ficoll 400 10%, EDTA 1.25mM)

Méthode :

1. Préparer le mélange suivant (proportions pour 1 tube) : 5µl de tampon PCR 10X, 8µl de MgCl₂ 25mM, 8 µl de dNTP 1.25mM, 2.5 µl de chacune des deux amorces, 22µl d'H₂O. Distribuer 48µl par tube et ajouter 2µl d'échantillon d'ADN, de témoin négatif sans ligase ou d'H₂O.
2. Transférer les tubes dans le thermocycleur et incubé 2 min à 80°C (conditions de « hot start »).
3. Ajouter dans chaque tube 50 µl du mélange suivant : 44 µl d'H₂O, 5 µl de tampon PCR 10X, 1 µl de Taq polymérase (5U/µl).
4. Effectuer la PCR aux températures suivantes : 30s à 95°C, 30s à 58°C et 45s à 68°C (7 cycles), puis 30s à 95°C et 1 min 15s à 68°C (17 à 23 cycles).
5. Analyser 8 µl de chaque réaction sur gel d'agarose 3% en utilisant le marqueur de taille 10 pb.
6. Si le signal est satisfaisant, réaliser 50 réactions analogues. Répartir la totalité des produits PCR dans 10 tubes de 2ml (1ml par tube). Ajouter 30µg de glycogène dans chaque tube. Extraire au PCI. Récupérer la phase aqueuse et précipiter l'ADN par centrifugation après avoir ajouté 0.1 volume d'acétate de sodium 3M et 1 volume d'isopropanol glacé. Rincer le culot à l'éthanol 75% puis sécher sous vide. Suspendre l'ensemble du matériel dans 500µl de TE et 125µl de tampon de charge.
7. Réaliser l'électrophorèse préparative sur gel vertical d'agarose à bas point de fusion 3%. La migration s'effectue sur 3h.
8. Couper le fragment à 132pb et placer les morceaux d'agarose dans un tube 2ml. Ajouter 0.1 volume de tampon β-Agarase 10X, incubé 10min à 70°C puis 10min à 40°C et ajouter la β-Agarase (6µl pour 200mg de gel). Incuber 1h30 à 40°C. Ajouter 30µg de glycogène dans chaque tube. Extraire au PCI et précipiter à l'isopropanol comme précédemment. Laver deux fois à l'éthanol 75%, sécher sous vide et reprendre le culot dans 420µl de TE.
9. Après détermination du nombre optimal de cycles d'amplification (10 en règle générale), réaliser une PCR à très grande échelle (270 réactions) avec 3µl d'ADN en suivant les points 1 à 4 du protocole.
10. Rassembler les produits PCR dans des tubes de 2ml. Extraire au PCI et précipiter à l'isopropanol (étape 6). Reprendre les culots dans 420µl d'H₂O et 50µl de Mix *Sau3AI* 10X et passer au Protocole 6, ou dans 500µl de TE et 125µl de tampon de charge si une purification sur acrylamide apparaît nécessaire.

II.7 Isolement et concaténation des ditags.

Les fragments de 132 pb amplifiés sont soumis à l'action de *Sau3AI* afin de séparer spécifiquement les ditags des adaptateurs. Les produits de digestions sont séparés sur gel polyacrylamide 12% (figure 48). Les fragments correspondant aux ditags sont découpés, purifiés et quantifiés (figure 49). La quantité des ditags est estimée à 50 ng/μl pour la banque de substance noire.

La concaténation est effectuée en présence de T4 DNA ligase (3h à 16°C). La quantité d'enzyme utilisée pour réaliser la ligature dépend de la quantité de ditags à concaténer.

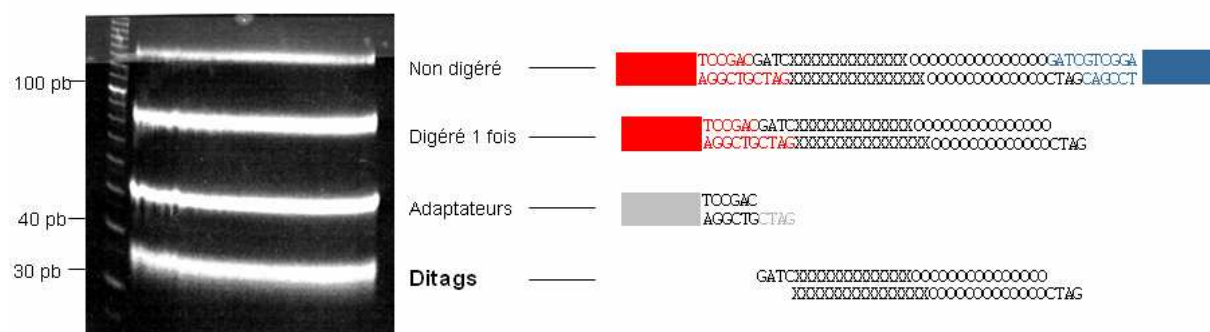


Figure 48. Purification des ditags. Après digestion (avec purification préalable du fragment de 132 pb réamplifié), les produits sont séparés sur un gel préparatif de polyacrylamide 12%. Le gel est visualisé sous UV après coloration au SYBR Green I. La nature des différents produits est indiquée sur la droite, la migration du marqueur de taille (ADN 10 pb, Invitrogen) à gauche.

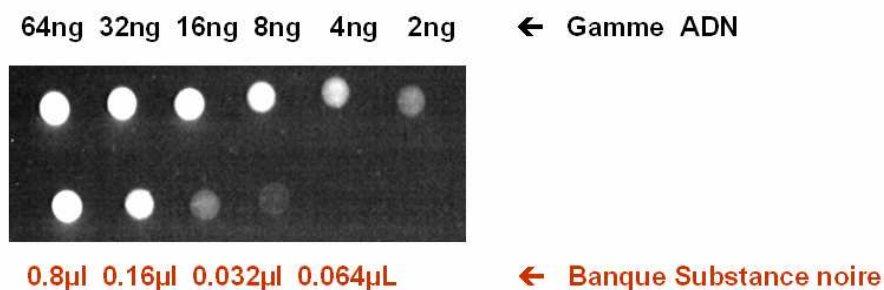


Figure 49. Quantification des ditags par la méthode « Ethidium Bromide DOT Quantitation ». Les intensités de fluorescence du BET de différentes dilutions des ditags sont comparées sous UV à 305 nm avec celles d'une gamme étalon d'ADN du phage λ digéré par *BstEII*.

Protocole 6 : isolement et concaténation des ditags

Equipements et réactifs :

- *Sau3AI* ($4\text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), tampon de réaction 10x et BSA 100X
- TAE 50X (Tris 2M, acide acétique 57%, EDTA 50mM)
- Gel de polyacrylamide 12% : 53,6ml d' H_2O , 24 ml de polyacrylamide 40% (19:1 acrylamide:bis), 1.6ml de TAE 50X, 800µl persulfate d'ammonium 10%, 69 µl TEMED
- ADN étalon 10pb , SYBR Green I stain (FMC bioproducts ref 50513)
- Matériel pour électrophorèse sur gel vertical (plaques 20 x 20cm, espaceur 1.5mm et peigne analytique)
- T4 DNA ligase $5\text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, tampon de ligature 5X, ATP 10mM
- Tampon de charge au xylène cyanol (xylène cyanol 0.125%, ficoll400 10%, EDTA 12.5mM)
- SpinX microcentrifuges tubes (Costar, ref 8160)

Méthode :

1. Sauvegarder 1µl du matériel. Ajouter 6µl de TE et 3µl de SB X5 et congeler à -20°C . Il sera déposé ultérieurement sur gel d'agarose.
2. Sur le reste de l'échantillon (469µl), ajouter 5µl de BSA 10mg/ml et 25µl de *Sau3AI* ($4\text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Incuber à 37°C à l'étuve.
3. Contrôler la digestion par *Sau3AI* après 3h d'incubation : analyser 1µl du matériel non digéré (sauvegardé au point 1), 1µl et 3µl du matériel digéré par *Sau3AI* (utiliser le bleu de bromophénol et le xylène cyanol pour l'ADN non digéré et digéré, respectivement) sur gel d'agarose 3%. Une fine bande correspondant aux ditags isolés doit être visible aux alentours de 30pb. Dans ce cas, poursuivre la digestion sur la nuit.
4. Ajouter 125µl de tampon de charge (xylène cyanol) aux produits de digestion et déposer sur un gel vertical de polyacrylamide 12% en TAE 1X. La migration est effectuée à 30mA jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit à 12cm des puits.
5. Transférer le gel dans une solution de SYBR Green dilué au 1:10 000 dans du TAE 1X. Placer sur une balancelle pendant 20min. Visualiser sous UV.

6. Couper la bande correspondant aux ditags isolés (30 pb) et transférer les fragments d'acrylamide dans des tubes de 0.5ml au fond percé. Placer ces derniers dans des tubes de 2ml et centrifuger 5 min à 10 000g. Préparer le tampon d'élution suivant pour chaque tube : 475µl de LoTE, 25µl d'acétate d'ammonium 10mM, 5µg de glycogène. Ajouter 250µl de tampon d'élution dans chaque tube et centrifuger à nouveau. Jeter les tubes 0.5ml et ajouter le reste du tampon dans les tubes 2ml directement. Incuber une nuit à 37°C sous agitation.
7. Le lendemain, déposer 20µg de glycogène au fond de 16 tubes à centrifugation Spin-X (le contenu de chaque tube 2ml est réparti dans deux tubes Spin-X). Centrifuger 5 min à 15.000g, 4°C. Rassembler les phases aqueuses de façon à constituer des échantillons de 800µl environ. Extraire au PCI, puis précipiter à l'éthanol (conditions *high concentration ethanol precipitation*). Laver 2 fois à l'éthanol 75%, sécher au dessiccateur et rassembler tous les culots dans 15µl de LoTE.
8. Mesurer la quantité de ditags purifiés par la méthode « Ethidium Bromide DOT Quantitation », en utilisant 1µl de l'échantillon.
9. Ligature des ditags en concatémères : pour 10µl d'ADN, ajouter 3.4µl de tampon de ligature 5X, 1.7µl d'ATP 10mM, 1.7µl de T4 DNA ligase (5U.µl⁻¹). Incuber au moins 3h à 16°C.
10. Après ligature, ajouter 30µg de glycogène et 280µl de TE. Extraire au PCI, récupérer la phase aqueuse et précipiter avec 100µl d'acétate d'ammonium et 1ml d'éthanol absolu. Rincer 2 fois à l'éthanol 75%, sécher au dessiccateur et reprendre le culot dans 15µl de TE.

II.8 Purification et clonage des concatémères.

Juste avant de les déposer sur le gel, les concatémères sont chauffés 5 min à 45°C afin de séparer les extrémités cohésives libres, afin d'éviter la présence de molécules circulaires.

Les profils de migration des produits de concaténation (gel de polyacrylamide 8%) révèlent une traînée s'étalant de quelques centaines à plusieurs milliers de paires de bases (figure 50). Les concatémères sont découpés dans le gel de façon à générer deux fractions : les fragments « courts » de taille comprise entre 400 pb et 700 pb, et les fragments « longs » de taille supérieure à 700 pb. La banque est générée à partir des fragments les plus longs, plus difficiles à cloner mais plus informatifs.

Les concatémères sont clonés dans le vecteur pBluescript II linéarisé par *Bam*HI et déphosphorylé après traitement à la phosphatase alcaline (figure 51). Les cellules compétentes utilisées doivent permettre d'obtenir une grande efficacité de transformation ($\geq 5 \times 10^9$ transformants. µg⁻¹d'ADN superenroulé). L'efficacité de transformation obtenue pour la banque de substance noire est donnée en table 11.

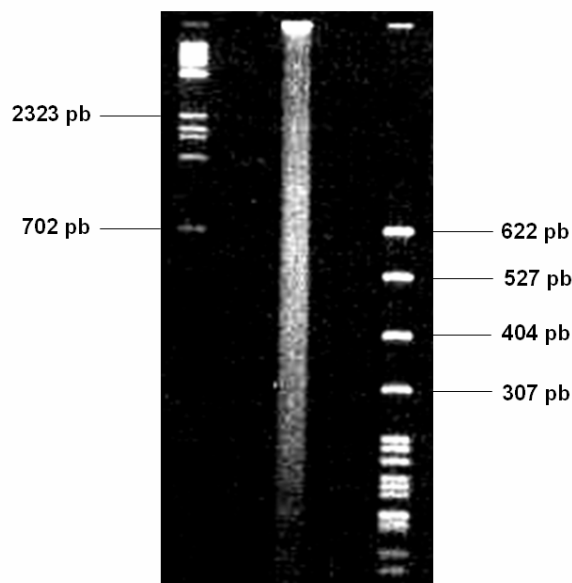
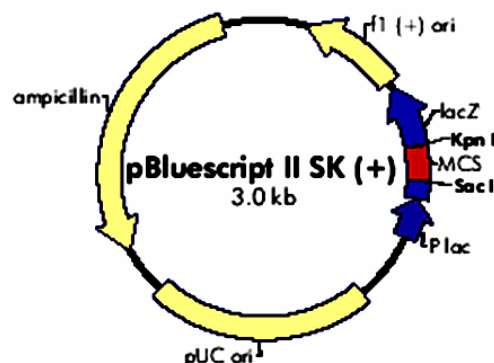


Figure 50. Profil de migration des produits de concaténation. La migration est réalisée sur gel vertical de polyacrylamide 8%. Après migration, le gel est coloré au SYBR Green I et visualisés sous UV à 305 nm. Les positions des marqueurs de tailles sont indiquées : à droite pour pBR digéré par *Msp*I, à gauche pour λ digéré par *Bst*EII.

f1 (+) origin 135-441
 β -galactosidase α -fragment 460-816
 multiple cloning site 653-760
 lac promoter 817-938
 pUC origin 1158-1825
 ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976-2833



**pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region
 (sequence shown 598-826)**

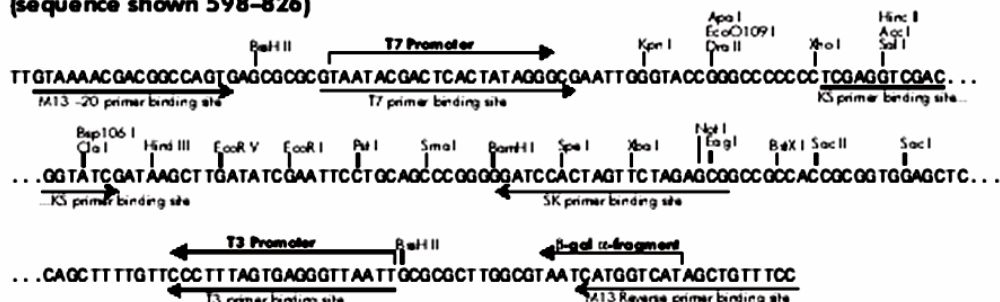


Figure 51. Vecteur pBluescript II SK (+/-). Le plasmide est linéarisé par l'enzyme de restriction *Bam*HI puis traité à la phosphatase alcaline. La ligation des concatémères est réalisée au niveau du site multiple de clonage, dans le gène LacZ. Le plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline.

	Colonies recombinantes
Concatémères 0.4-0.7 kb	55 200
Concatémères > 0.7 kb	74 089

Table 11. Efficacité de transformation des cellules compétentes XL10 gold par les concatémères clonés dans pBluescript II.

Protocole 7 : purification et clonage des concatémères

Equipements et réactifs :

- Matériel pour électrophorèse sur gel vertical (plaques 20 x 20cm, espaceur 1.5mm et peigne analytique)
- Gel polyacrylamide 8% : 61.6 ml d'H₂O, 16ml de polyacrylamide 40% (37.5:1 acrylamide:bis), 16ml de TAE 50X, 800µl de persulfate d'ammonium 10%, 69µl de TEMED
- ATP 10 mM
- Marqueur de taille pBR *Msp*I et λ *Bst*II
- T4 DNA ligase 1U.µl⁻¹ (Invitrogen, ref 15224-017) et tampon de réaction 5X
- pBluescript II, linéarisé avec *Bam*HI et déphosphorylé
- *E.Coli* XL10gold ultracompetent cells® (Stratagen, ref 200150)

Méthode :

1. Incuber l'échantillon 5min à 45°C puis charger la totalité dans un puits d'un gel analytique de polyacrylamide 8%. Faire migrer à 30mA jusqu'à ce que le bleu de bromophénol soit à 10-12cm du puits.
2. Colorer le gel dans du SYBR Green (comme décrit dans le Protocole 6) et visualiser sous UV.
3. Les concatémères forment une traînée sur le gel. Découper les régions contenant des ADN de taille : comprise entre 0.4kb et 0.7kb, 0.7kb et 2kb, supérieure à 2kb. Purifier séparément les ADN de chacune des fractions de la même façon que dans le Protocole 6.
4. Reprendre les culots dans 4µl (25ng) de pBluescript II linéarisé par *Bam*HI et 3µl d'eau. Chauffer 5min à 45°C et mettre sur glace.
5. Ajouter 2µl de tampon de ligature 5X, 1µl d'ATP 10mM et 1µl de T4 DNA ligase 1U.µl⁻¹. Laisser une nuit à 16°C.
6. Ajouter 20µg de glycogène et 285µl de LoTE et extraire au PCI. Précipiter à l'éthanol, rincer deux fois à l'éthanol 75%, sécher sous vide le culot et resuspendre dans 12µl de LoTE.
7. Transformer les *E.Coli* XL10 gold ultracompetent cells® avec 2 µl du produit de ligature selon les recommandations du fabricant. Etaler différents volumes (5µl, 10µl, 20µl) sur milieu LB supplémenté en ampicilline, Xgal et IPTG. Incuber 15-16h à 37°C. Conserver le reste du produit de transformation dans du glycérol (16% final) à -80°C.
8. Compter la proportion de colonies pour lesquelles l'insertion a eu lieu (clones blancs) et celle pour lesquelles il n'y a pas eu d'insertion (clones bleus). La proportion de clones blancs doit être supérieure à 50% et la quantité de colonies blanches >10 000.

II.9 Séquençage des concatémères.

Le séquençage des concatémères est en partie réalisé au laboratoire, afin d'estimer la qualité de la banque avant séquençage à grande échelle au Génoscope. Les réactions de séquences sont effectuées sur des mini-préparations d'ADN, en suivant le protocole du kit *Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing* (Ref 4303153 ; Applied Biosystems). Les concatémères sont ensuite séquencés par le séquenceur 377XL DNA Analyser (Applied Biosystems).

Au Génoscope, le séquençage est réalisé à grande échelle (plusieurs milliers de minipréparations d'ADN) par le séquenceur 3730XL DNA Analyser (Applied Biosystems).

III HYBRIDATION *IN SITU*

III.1 Synthèse des ribosondes

Protocole

Equipements et réactifs

- Kit de transcription *in vitro* (Riboprobe combination system t3/t7, Promega, P1450)
- Digoxigenin-11-UTP (Roche, ref 1 209 256)
- Bain à 37°C

Méthode

1. Préparer 12 µl du mélange suivant : 4 µl de tampon 5X, 2 µl de DTT 100 mM, 1 µl de rGTP 10 mM, 1 µl de rATP 10 mM, 1 µl de rCTP 10 mM, 0,65 µl de rUTP 10 mM, 0,35 µl de DIG-11-UTP 10 mM (Roche), 1 µl de RNasin 40 U/µl, 1 µl de T7 ou T4 RNAPol,
2. Ajouter environ 1 µg de matrice ADN et compléter avec de l'eau propre jusqu'à 20 µl.
3. Incuber 2 h à 37°C
4. Ajouter 2 µl de Dnase RQ1 par réaction (2 U/µg) et incuber 15 min à 37°C
5. Contrôler la transcription comme suit : prélever 1 µl de la réaction, ajouter 5 µl d'eau et 3 µl de SB 5X. Dénaturer 3 min à 65°C et placer immédiatement dans la glace. Déposer sur gel d'agarose 0.8 % et révéler sous UV.
6. Traiter le reste de la réaction comme suit : Ajouter 100 µl TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) puis, sous la sorbonne 122 µl (*i.e.* 1 volume) de PCI
7. Vortexer puis centrifuger 10 min à 11.000 g, température ambiante
8. Récupérer la phase aqueuse dans un tube propre de 1.5 ml
9. Ajouter 10 µl de LiCl 4 M (0.3 M final) et vortexer
10. Ajouter 300 µl d'EtOH 100% froid et centrifuger 30 min à 15.000 g, 4°C
11. Laver 2 fois avec EtOH 75% et centrifuger 5 min à 15.000 g, 4°C
12. Reprendre les culots dans 50 à 100 µl de TE

III.2 Préparation des tissus et des sections

Après anesthésie au pentobarbital sodique, les souris mâles C57/BL6 de 12 semaines sont décapitées, leur cerveau prélevé et immédiatement congelé dans l'isopentane à -45°C. Les cerveaux peuvent être conservés plusieurs mois à -80°C.

L'hybridation *in situ* est réalisée sur des coupes de 20 µm d'épaisseur effectuées au cryostat à -28°C. Les lames sont stockées à -80°C.

III.3 Hybridation

Toutes les solutions seront filtrées sur des filtres 0.45µm.

Protocole

Equipements et réactifs

- Tampon d'hybridation (conservé à -20°C) : NaCl 0.195 M, Tris HCl pH 7.5 10 mM, Na₂HPO₄ 5.8 mM, NaH₂PO₄ 4.2 mM, EDTA 0.5 mM, Formamide 50%, Dextran sulfate 10%, tRNA de levure 1 mg/ ml, Denhardt's 1X.
- Cuve à coloration Hellendahl
- Bain à 65°C

Méthode

1. Décongeler les lames sur un lit de glace pendant quelques minutes et les placer dans une cuve Hellendahl (toutes les solutions versées dans la cuve auront un volume de 100 ml par utilisation)
2. Sous la sorbonne : plonger les lames 20 min dans de la PFA 4% à 4°C.
3. Faire 5 lavages de 5 min dans du PBS 1X à 4°C.
4. Pour une lame : ajouter, dans 150 µl de solution d'hybridation 10 µl de sonde préalablement dénaturée (3 min à 65°C). Verser la solution sur la lame, recouvrir d'une lamelle.
5. L'hybridation est réalisée sur la nuit à 65°C, en chambre humide, au bain-marie traditionnel.

III.4 Lavages post-hybridation

Protocole

Equipements et réactifs

- Tampon1 : SSC 1X, Formamide désionisée 50%, Tween20 0.1%
- Tampon2 : TBST 1X préparé à partir d'une solution mère de TBST 20X : NaCl 16g/100 ml, KCl 0.4g/100 ml, Tris-Hcl 1 M pH 7.5 50 ml/100 ml, Tween20 2 ml/100 ml
- Cuve à coloration Hellendahl
- Bain à 65°C

Méthode

1. Placer les lames dans 100 ml de tampon1
2. Transférer dans un nouveau bain de tampon1 préchauffé à 65°C et incubé 1 h sous agitation modérée
3. Transférer dans un nouveau bain de tampon1 préchauffé à 65°C et incubé 30 min sans agitation

4. Laisser refroidir quelques minutes à température ambiante
5. Placer les lames dans du TBST 1X, 30 min à température ambiante
6. Transférer dans un nouveau bain de TBST 1X, 30 min à température ambiante

III.5 Révélation du marquage

Protocole

Equipements et réactifs

- DAKOpen (DAKO, s200230)
- Anticorps : sheep anti-digoxigenin-AP Fab fragments (Roche, ref 1 093 274)
- Sérum normal de chèvre (Vector laboratories, S-1000)
- Solution de blocage : TBST 1X, Sérum normal de chèvre 20%, Gélatine 0.5%
- NTMT (à préparer extemporanément) : NaCl 100 mM, Tris Base 100 mM, MgCl₂ 50 mM, Tween20 0.1%, Lévaamisole 50 mg/100 ml. Ajuster le pH de la solution à 9.5 (pH optimal pour l'activité de la phosphatase alcaline)
- BCIP (Roche, ref 760 994) et NTMT (Roche, ref 1 087 479)
- Milieu de montage des lames pour la microscopie : Faramount aqueous mounting medium (DAKO, S3025)
- Chambre humide

Méthode

1. Egoutter les lames, les essuyer et les placer en chambre humide après avoir entouré les coupes d'un trait de DAKOpen
2. Déposer 400 µl de solution de blocage sur chaque lame et laisser plus d'1 h à température ambiante
3. Egoutter les lames et déposer à nouveau 400 µl de solution de blocage contenant l'anticorps anti-digoxigénine dilué au 1:2000. *Ne pas oublier le témoin sans Ac*
4. Incuber sur la nuit à 4°C
5. Laver les lames 5 fois 20 min dans du TBST 1X (le témoin sans anticorps est ajouté au 2^{ème} lavage)
6. Laver les lames dans du NTMT, 2 fois 10 min à température ambiante
7. Révéler l'anti-digoxigénine dans 100 ml de NTMT contenant 667 µl de NBT 50 µg/µl, et 333 µl de BCIP 50 µg/µl (de 4 à 16 h, en fonction de l'intensité du marquage).
8. Stopper la réaction de révélation par 2 bains de TE (Tris 10 mM – EDTA 1 mM).
9. Placer les lames dans du PBS 1X à 4°C.
10. Monter les lames en utilisant un milieu de montage aqueux.

IV EXTRACTION D'ARN A PARTIR DE REGIONS ISOLEES

IV.1 Préparation des solutions

Equipements et réactifs

- Phénol GIBCO-BRL, ref 5509 UA
- Bain à 60°C

Méthode

Tampon de lyse :

1. Mélanger : 25 g de Guanidium Thyocianate, 29.3 ml d' H₂O DEPC, 1.3 ml de Tri-Sodium Citrate 1M, pH7, 2.64 ml de Sarcosyl 10%. Le volume final doit être de 53 ml : compléter avec H₂O DEPC si besoin.
2. Le tampon se conserve environ 3 mois à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Phénol acide :

1. Pour un flacon de 100 g de phénol:
2. Faire fondre le phénol au bain-marie à 60°C.
3. Ajouter 60 ml d'H₂O DEPC.
4. Bien agiter et laisser décanter une nuit à 4°C.
5. Le lendemain réaspirer la phase aqueuse et ajouter 110 mg d'hydroxyquinoline
6. Aliquoter en fractions de 10 ml.
7. Congeler à -20°C jusqu'au moment de l'emploi. Le phénol doit être conservé au froid et à l'abri de la lumière. Le même tube peut être congelé/décongelé plusieurs fois s'il est resté décongelé moins de 24h.

IV.2 Protocole d'extraction

Equipements et réactifs

- La solution dénaturante (solution D) est préparée en ajoutant extemporanément le β-mercaptoéthanol: 7.2 µl β-ME/ml de tampon de lyse.
- Pour tous les pipetages, utiliser des cônes "anti-contamination" ou des pipettes à usage unique.

Méthode

1. Dans chaque tube mettre: 500 µl de solution D (1 volume) contenant l'échantillon broyé au Dounce et 40 µg de glycogène. Vortexer et centrifuger.
2. Ajouter 50 µl de Na acétate 2 M, pH 4.0 (0.1 volume). Vortexer.

3. Ajouter 500 µl de phénol acide (1 volume). Vortexer 20 secondes.
4. Ajouter 100 µl de chloroforme (0.2 volume). Vortexer 2 fois 20 secondes.
5. Centrifuger à 4°C minimum 20 min à 12000 g.
6. Récupérer la phase aqueuse qui contient les ARN avec un cône anti-contamination. Attention à ne pas pipeter de phase organique, qui contient l'ADN et les protéines.
7. À la phase aqueuse, ajouter 550 µl d'isopropanol glacé (1,1 volume).
8. Centrifuger minimum 20 min à 4°C, 15000 g.
9. Éliminer délicatement le surnageant à la trompe à vide.
10. Reprendre le culot dans 300 µl de solution D en tapotant le fond du tube.
11. Ajouter 300 µl d'isopropanol glacé.
12. Centrifuger 20 min à 4°C, 15000 g.
13. Éliminer délicatement le surnageant à la trompe à vide.
14. Ajouter 400 µl d'éthanol à 75% glacé et mélanger par retournement en évitant de décoller le culot d'ARN.
15. Centrifuger 10 min à 4°C, 15000 g. Éliminer le surnageant et faire un second lavage en éthanol 75%.
16. Sécher sous vide 5 min.
17. Redissoudre le culot dans 50 µl de TE pH 7.6 RNA grade (0.1 volume).
18. Doser au spectrophotomètre UV un aliquot dilué au 1/25^{ème} (2 µl dans 50 µl d'eau).
19. Stocker les ARN à -80°C.

V RT-PCR QUANTITATIVE

V.1 Principe

Après une étape de transcription inverse des ARNm en ADNc, une séquence nucléotidique spécifique est amplifiée à l'aide d'un couple d'amorces encadrant la région cible. Au cours de cette étape de PCR, l'incorporation d'un fluorophore (SYBR Green®) permet la quantification et le suivi en temps réel de la quantité de produit d'amplification formé.

Afin de standardiser et normaliser les différentes analyses, on réalise en parallèle la quantification de l'ARNm endogène et ubiquitaire de la cyclophiline A. La RT-PCR quantitative de ce gène de référence permet de comparer les résultats d'une PCR à l'autre, et de pouvoir déterminer l'expression de la tyrosine hydroxylase dans un échantillon par rapport à son expression dans un autre échantillon.

A l'inverse d'une PCR classique, où l'analyse des résultats se fait par mesure de la quantité de produit formé après un nombre de cycles prédéfinis, la RT-PCR quantitative permet la détermination d'un cycle seuil (Ct) pour lequel le produit de PCR atteint une

quantité donnée (fluorescence seuil). Les valeurs de Ct calculées correspondent au cycle de démarrage de la phase exponentielle d'amplification.

La spécificité d'amplification est assurée par dénaturation du produit d'amplification et calcul du T_m (température de fusion). Elle est également contrôlée par la migration des produits d'amplification sur gel d'agarose.

V.2 Protocole

Transcription inverse

Equipements et réactifs

- RQ1 RNase-free DNase (Promega, M6101)
- SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, ref 18064)
- Thermocycleur

Méthode

1. Pour 1 µg d'ARN en TE pH7.5, ajouter : 1 µl de tampon 10X RQ1 DNase I, 1µl de RQ1 DNase I (1U/µl). Compléter avec de l'eau jusqu'à 10µl.
2. Incuber 30 min à 37°C.
3. Ajouter 1µl de Stop Solution et incuber 10 min à 65°C pour inactiver la DNase
4. Ajouter 29µl de tampon de dilution (490 µl de TE, pH 7.6, 10 µl de DTT 0.1 M, 0.5 µl de RNasin). On doit obtenir une solution d'ARN totaux à 25 ng/µl.
5. Pour chaque tube, préparer :
 - un mix oligo : 1.6 µl d'eau, 5µl de tampon RT 5X, 10 µl de pdN6 10 µM, 0.4 µl de RNasin (40 U/µl).
 - un mix RT+ : 13 µl d'eau, 5 µl de tampon RT 5X, 4 µl de DTT 0.1 M, 2 µl de dNTP 5 mM, 1 µl de Superscript II (200 U/µl)
 - un mix RT- : 7 µl d'eau, 2.5 µl de tampon RT 5X, 2 µl de DTT 0.1 M, 1 µl de dNTP 5 mM
6. Déposer dans chaque tube de RT+ 17 µl de mix oligo et 8 µl d'ARN à 25 ng/µl, et dans chaque tube RT- 8.5 µl de mix oligo et 4 µl d'ARN à 25 ng/µl.
7. Incuber 3 min à 80°C pour dénaturer les ARN et maintenir la température à 30°C.
8. Ajouter 25 µl de mix RT+ ou 12.5 µl de mix RT-.
9. Incuber les temps suivants : 10 min à 30°C, 1 h à 42°C et maintenir à 37°C.
10. Ajouter 1 µl de RNaseH dans tous les tubes et incuber 20 min à 37°C puis arrêter la réaction 10 min à 80°C.
11. Transférer la moitié de la synthèse, soit 25 µl d'ADNc (à 4 ng/µl) dans un tube de 1.5 ml et diluer par 475 µl d'eau/BSA 1X. On doit obtenir une solution d'ADNc à 0.2 ng/µl.

PCR quantitative

Equipements et réactifs

- Thermocycleur ABI 7000 SDS (Applied Biosystems)
- SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, ref 4309155)

Méthode

1. Pour chaque puits de la plaque, préparer 15µl de la solution suivante : 12.5µl de SYBR Green PCR Master Mix 2X, 1µl d'eau, 0.75µl d'oligonucléotide sens (10µM), 0.75µl d'oligonucléotide antisens (10µM).
2. Ajouter 10µl de chaque ADNc dilué et centrifuger la plaque pendant 3 min à 3 000g.
3. Incuber les temps suivants : 10min à 95°C (1 cycle), puis 15s à 95°C et 1min à 60°C (40 cycles).

VI INTOXICATION DES RATS A LA 6-HYDROXYDOPAMINE.

Après anesthésie (xylazine/kétamine), vingt-deux rats mâles Sprague-Dawley (d'environ 300 g au moment de l'expérimentation) ont reçu deux injections stéréotaxiques de 2,5 µl et 2 µl de 6-OHDA (3,5 µg/µl à un débit de 0,25 µl/30 sec), ou d'un volume équivalent de son tampon de dilution (acide ascorbique 0,2 %, NaCl 0,9 %) au niveau faisceau médian du télencéphale basal (FMT ; *cf.* figure 53), selon des coordonnées précises (*cf.* table 12). Huit rats ont été réservés pour les analyses comportementales et histologiques. Les 14 rats restants ont été sacrifiés, 24_{6-OHDA} = 8 ; n_{Témoins} = 4) ou 7 jours (n_{6-OHDA} = 6 ; n_{Témoins} = 4) après intoxication. Leurs cerveaux ont été immédiatement prélevés, et placés dans une matrice pour rats placée sur la glace afin d'être tranchés. Les striata ont été rapidement disséqués au scalpel sur des sections de 1 mm ; la dissection des substances noires a été réalisée au scalpel sur des sections de 300 µm après découpe au vibratome. L'extraction des ARN a été réalisée comme décrit précédemment.

Coordonnées des sites d'injection (en mm par apport au bregma)		
	Site 1	Site 2
Axe antero-postérieur	-3,8	-4,4
Axe médio-latéral	-1,6	-1,4
Axe dorso-ventral	-7,8	-3,9

Table 12. Coordonnées stéréotaxiques des sites d'injection de la 6-OHDA dans le FMT

VI.1 Tests comportementaux

Tous les tests comportementaux ont été réalisés 15 jours après l'injection de 6-OHDA.

VI.1.1 Test du cylindre

Pour réaliser ce test, les 6 rats traités à la 6-OHDA et 2 rats témoins non-opérés ont été placés dans un cylindre transparent en plexiglas (*cf.* figure 52) pendant environ 15 minutes (période d'habituation) et le nombre d'appuis de leurs pattes antérieures gauche et droite ont été comptés pendant 2 min.



Figure 52. Dispositif expérimental du test du cylindre.

VI.1.2 Test de rotation à l'apomorphine

Trente minute après une injection d'apomorphine (0,5 mg/kg en intrapéritonéale), les rotations complètes (360°) des 6 rats traités à la 6-OHDA ont été comptabilisées pendant 5 minutes à partir de leur apparition. Les sens de rotation (droite ou gauche) ont été distingués.

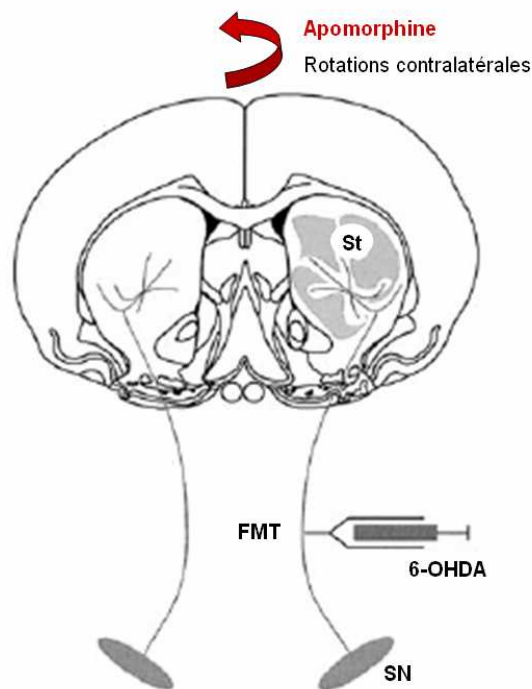


Figure 53. Représentation schématique de la voie nigrostriée et des rotations contralatérales induites par l'apomorphine. Les zones grisées dans le striatum indiquent la perte de dopamine liée à l'injection de 6-OHDA dans le FMT. La flèche rouge représente le mouvement de rotation de l'animal induit par l'administration d'apomorphine. **FMT** : faisceau médian du télencéphale basal ; **SN** : substance noire ; **St** : striatum.

D'après Deumens et al., 2002.

VI.2 Immunohistochimie de la tyrosine hydroxylase

L'immunohistochimie a été réalisée 20 jours après injection. Après perfusion intracardiaque des animaux avec une solution de PFA 4 % (30 ml/min pendant 10 min), les cerveaux sont prélevés ($n_{6\text{-OHDA}} = 6$; $n_{\text{Témoins}} = 2$), et conservés dans la PFA 4 % pendant une nuit afin d'assurer une post-fixation efficace des tissus. Après cryoprotection (bains successifs dans du sucre 15 % à 30 %, 4°C), les cerveaux sont découpés au microtome en sections de 30 μm d'épaisseur (coupes sériées, 1 coupe/300 μm). L'immunohistochimie a été réalisée avec un anticorps dirigé contre la tyrosine hydroxylase (TH ; 1 : 10 000, Jacques Boy), selon le même protocole que celui décrit dans la publication n°2.

VII GENERATION DE SOURIS AGPAT4+/-

Les cellules souches embryonnaires contenant la construction gene trap insérée dans *Agpat4* (lignée CC0173) ont été fournies par le Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/genetrap/>).

L'insertion de la construction a été vérifiée par séquençage des produits de RT-PCR réalisée avec une amorce spécifique du premier exon d'*Agpat4* (Agpat4-F 5' TTTCCAGTGTGGCTGACTTA 3'), et une amorce spécifique de la construction (Bgeo-R 5' ATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGG 3').

Le caryotype de la lignée a été vérifié comme suit :

1. Répartir 2.10^6 cellules sur une boîte de petri gélatinée de 6cm de diamètre et incubé à 37°C sur la nuit.
2. Ajouter 0.06µg/ml de colcémide (dérivé de la colchicine qui bloque la mitose en métaphase en empêchant la formation du fuseau mitotique). Incuber à 37°C pendant 3h.
3. Laver les cellules dans du PBS 1x, délicatement pour ne pas détacher les cellules. Ajouter 1ml de trypsine-EDTA et incubé au moins 5min. Ajouter 4ml de milieu de culture D10. Dissocier les cellules par up&down jusqu'à l'obtention d'une suspension de cellules bien individualisées. Centrifuger 5min, 1000rpm.
4. Enlever le milieu (laisser environ 100µl) et resuspendre le culot. Ajouter 5ml de solution hypotonique (KCl 0.56% W/V dans H₂O). Laisser 6min à température ambiante. Cette étape a pour but de faire gonfler les cellules. Centrifuger 5min, 1000rpm.
5. Enlever la solution hypotonique (laisser environ 100µl) et resuspendre le culot. Ajouter 5ml de solution de fixation (3 volumes de méthanol, 1 volume d'acide acétique). Incuber 20min à température ambiante. Centrifuger 5min, 1000rpm.
6. Enlever la solution de fixation. Resuspendre le culot dans 5ml de solution de fixation fraîche. Incuber 5min à température ambiante. Centrifuger 5min, 1000rpm.
7. Enlever la solution de fixation. Resuspendre le culot dans 0.5ml de solution de fixation fraîche.
8. Laver les lames dans l'acétone puis dans l'H₂O. Laisser sécher. Immerger les lames dans l'EtOH 40% pendant 1min. Enlever l'excès de liquide.
9. Tenir les lames inclinées et laisser tomber 1 à 3 gouttes de la suspension de cellules, depuis une hauteur de 50cm environ.
10. Sécher les lames (sous une ampoule 100W ou sur une plaque chauffante)
11. Laver les lames dans le PBS pour enlever les résidus acides.
12. Fixer au GIEMSA (dilution 1 :10 dans Na₂HPO₄).

Les cellules ES (issue de la souche de souris ola129) ont ensuite été injectées dans des blastocytes C57BL/6. Les souris chimériques mâles ainsi produites ont été croisées avec des femelles C57BL/6 afin de générer des individus hétérozygotes. Leurs descendants ont été génotypés par PCR avec un couple d'amorces spécifique de l'allèle sauvage d'Agpat4 (Agpat4-F 5' TTTCCAGTGTTGGCTGACTTA 3' et Agpat4-R 5' CGAGCCTATCCCTTCCAAAG 3') et un couple spécifique de LacZ (LacZ-F 5' ATGTTGAAGTGGCGAGCGAT 3' et LacZ-R 5' GCAGTAAGGCGGTCTCGGGATA 3'). La combinaison des deux couples permet de différencier les souris sauvages des souris hétérozygotes.

BIBLIOGRAPHIE

- Agarwal A. K., and Garg A. (2003). Congenital generalized lipodystrophy: significance of triglyceride biosynthetic pathways. *Trends Endocrinol Metab* **14**: 214-21.
- Agid Y. (1991). Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet* **337**: 1321-4.
- Aizman O., Brismar H., Uhlen P., Zettergren E., Levey A. I., Forssberg H., Greengard P., and Aperia A. (2000). Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci* **3**: 226-30.
- Albin R. L., Young A. B., and Penney J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* **12**: 366-75.
- Aldape K., Gininger D. G., and Godfrey T. E. (2002). Real-time quantitative polymerase chain reaction: a potential tool for genetic analysis in neuropathology. *Brain Pathol* **12**: 54-66.
- Alexander G. E., and Crutcher M. D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* **13**: 266-71.
- Alexander G. E., Crutcher M. D., and DeLong M. R. (1990). Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res* **85**: 119-46.
- Ambrose C. M., Duyao M. P., Barnes G., Bates G. P., Lin C. S., Srinidhi J., Baxendale S., Hummerich H., Lehrach H., Altherr M., and et al. (1994). Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat Cell Mol Genet* **20**: 27-38.
- Anca M. H., Gazit E., Loewenthal R., Ostrovsky O., Frydman M., and Giladi N. (2004). Different phenotypic expression in monozygotic twins with Huntington disease. *Am J Med Genet A* **124**: 89-91.
- Anderson L., and Seilhamer J. (1997). A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* **18**: 533-7.
- Andreu P., Colnot S., Godard C., Laurent-Puig P., Lamarque D., Kahn A., Perret C., and Romagnolo B. (2006). Identification of the IFITM family as a new molecular marker in human colorectal tumors. *Cancer Res* **66**: 1949-55.
- Andrew R., Watson D. G., Best S. A., Midgley J. M., Wenlong H., and Petty R. K. (1993a). The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochem Res* **18**: 1175-7.
- Andrew S. E., Goldberg Y. P., Kremer B., Telenius H., Theilmann J., Adam S., Starr E., Squitieri F., Lin B., Kalchman M. A., and et al. (1993b). The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* **4**: 398-403.
- Aosaki T., Kimura M., and Graybiel A. M. (1995). Temporal and spatial characteristics of tonically active neurons of the primate's striatum. *J Neurophysiol* **73**: 1234-52.
- Arrasate M., Mitra S., Schweitzer E. S., Segal M. R., and Finkbeiner S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* **431**: 805-10.
- Ashburner M., Ball C. A., Blake J. A., Botstein D., Butler H., Cherry J. M., Davis A. P., Dolinski K., Dwight S. S., Eppig J. T., Harris M. A., Hill D. P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J. C., Richardson J. E., Ringwald M., Rubin G. M., and Sherlock G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**: 25-9.

- Augood S. J., Faull R. L., and Emson P. C. (1997). Dopamine D1 and D2 receptor gene expression in the striatum in Huntington's disease. *Ann Neurol* **42**: 215-21.
- Augood S. J., Faull R. L., Love D. R., and Emson P. C. (1996). Reduction in enkephalin and substance P messenger RNA in the striatum of early grade Huntington's disease: a detailed cellular in situ hybridization study. *Neuroscience* **72**: 1023-36.
- Auluck P. K., Chan H. Y., Trojanowski J. Q., Lee V. M., and Bonini N. M. (2002). Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. *Science* **295**: 865-8.
- Bae B. I., Xu H., Igarashi S., Fujimuro M., Agrawal N., Taya Y., Hayward S. D., Moran T. H., Montell C., Ross C. A., Snyder S. H., and Sawa A. (2005). p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron* **47**: 29-41.
- Baliko L., Csala B., and Czopf J. (2004). Suicide in Hungarian Huntington's disease patients. *Neuroepidemiology* **23**: 258-60.
- Benn C. L., Landles C., Li H., Strand A. D., Woodman B., Sathasivam K., Li S. H., Ghazi-Noori S., Hockly E., Faruque S. M., Cha J. H., Sharpe P. T., Olson J. M., Li X. J., and Bates G. P. (2005). Contribution of nuclear and extranuclear polyQ to neurological phenotypes in mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **14**: 3065-78.
- Benn G. B. a. C. (2002). The polyglutamine diseases. In "Huntington's disease" (P. H. a. L. J. G Bates, Ed.), pp. 429-474, Oxford University Press, New York.
- Bennett B. D., and Bolam J. P. (1993). Characterization of calretinin-immunoreactive structures in the striatum of the rat. *Brain Res* **609**: 137-48.
- Berg D., Schweitzer K., Leitner P., Zimprich A., Lichtner P., Belcredi P., Brussel T., Schulte C., Maass S., and Nagele T. (2005). Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease*. *Brain* **128**: 3000-11.
- Bergson C., Mrzljak L., Smiley J. F., Pappy M., Levenson R., and Goldman-Rakic P. S. (1995). Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci* **15**: 7821-36.
- Berke J. D., Paletzki R. F., Aronson G. J., Hyman S. E., and Gerfen C. R. (1998). A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation. *J Neurosci* **18**: 5301-10.
- Berridge K. C., and Robinson T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* **28**: 309-69.
- Bevan M. D., and Bolam J. P. (1995). Cholinergic, GABAergic, and glutamate-enriched inputs from the mesopontine tegmentum to the subthalamic nucleus in the rat. *J Neurosci* **15**: 7105-20.
- Bibb J. A., Yan Z., Svenningsson P., Snyder G. L., Pieribone V. A., Horiuchi A., Nairn A. C., Messer A., and Greengard P. (2000). Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6809-14.
- Bjorklund A., and Dunnett S. B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* **30**: 194-202.
- Bjorklund A., and Lindvall O. (1984). Dopamine-containing systems in the CNS. In "Handbook of chemical neuroanatomy, Vol.2: Classical transmitters in the CNS, Part I" (A. Bjorklund, and T. Hökfelt, Eds.), pp. 55-122, Elsevier.
- Blalock E. M., Chen K. C., Sharrow K., Herman J. P., Porter N. M., Foster T. C., and Landfield P. W. (2003). Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J Neurosci* **23**: 3807-19.
- Blalock E. M., Geddes J. W., Chen K. C., Porter N. M., Markesbery W. R., and Landfield P. W. (2004). Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major

- transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2173-8.
- Bloomquist B. T., Darlington D. N., Mains R. E., and Eipper B. A. (1994). RESP18, a novel endocrine secretory protein transcript, and four other transcripts are regulated in parallel with pro-opiomelanocortin in melanotropes. *J Biol Chem* **269**: 9113-22.
- Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M., Benabid A. L., Sadoul R., and Verna J. M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* **65**: 135-72.
- Bodner R. A., Outeiro T. F., Altmann S., Maxwell M. M., Cho S. H., Hyman B. T., McLean P. J., Young A. B., Housman D. E., and Kazantsev A. G. (2006). Pharmacological promotion of inclusion formation: a therapeutic approach for Huntington's and Parkinson's diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 4246-51.
- Bolam J. P., Somogyi P., Takagi H., Fodor I., and Smith A. D. (1983). Localization of substance P-like immunoreactivity in neurons and nerve terminals in the neostriatum of the rat: a correlated light and electron microscopic study. *J Neurocytol* **12**: 325-44.
- Bonifati V., Breedveld G. J., Squitieri F., Vanacore N., Brustenghi P., Harhangi B. S., Montagna P., Cannella M., Fabbrini G., Rizzu P., van Duijn C. M., Oostra B. A., Meco G., and Heutink P. (2002). Localization of autosomal recessive early-onset parkinsonism to chromosome 1p36 (PARK7) in an independent dataset. *Ann Neurol* **51**: 253-6.
- Bonner R. F., Emmert-Buck M., Cole K., Pohida T., Chuaqui R., Goldstein S., and Liotta L. A. (1997). Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* **278**: 1481,1483.
- Boon K., Edwards J. B., Eberhart C. G., and Riggins G. J. (2004a). Identification of astrocytoma associated genes including cell surface markers. *BMC Cancer* **4**: 39.
- Boon W. M., Beissbarth T., Hyde L., Smyth G., Gunnensen J., Denton D. A., Scott H., and Tan S. S. (2004b). A comparative analysis of transcribed genes in the mouse hypothalamus and neocortex reveals chromosomal clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14972-7.
- Braitenberg V. (1998). "Cortex: statistics and geometry of neuronal connectivity. 2nd edition," Springer Verlag, Berlin and New York.
- Brooks W. M., Lynch P. J., Ingle C. C., Hatton A., Emson P. C., Faull R. L., and Starkey M. P. (2007). Gene expression profiles of metabolic enzyme transcripts in Alzheimer's disease. *Brain Res* **1127**: 127-35.
- Brouillet E., Jacquard C., Bizat N., and Blum D. (2005). 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* **95**: 1521-40.
- Busch A., Engemann S., Lurz R., Okazawa H., Lehrach H., and Wanker E. E. (2003). Mutant huntingtin promotes the fibrillogenesis of wild-type huntingtin: a potential mechanism for loss of huntingtin function in Huntington's disease. *J Biol Chem* **278**: 41452-61.
- Bussell R., Jr., and Eliezer D. (2001). Residual structure and dynamics in Parkinson's disease-associated mutants of alpha-synuclein. *J Biol Chem* **276**: 45996-6003.
- Canettieri G., Franchi A., Sibilla R., Guzman E., and Centanni M. (2004). Functional characterisation of the CRE/TATA box unit of type 2 deiodinase gene promoter in a human choriocarcinoma cell line. *J Mol Endocrinol* **33**: 51-8.
- Carninci P., Kasukawa T., Katayama S., Gough J., Frith M. C., Maeda N., Oyama R., Ravasi T., Lenhard B., Wells C., Kodzius R., Shimokawa K., Bajic V. B., Brenner S. E., Batalov S., Forrest A. R., Zavolan M., Davis M. J., Wilming L. G., Aidinis V., Allen J. E., Ambesi-Impiombato A., Apweiler R., Aturaliya R. N., Bailey T. L., Bansal M.,

- Baxter L., Beisel K. W., Bersano T., Bono H., Chalk A. M., Chiu K. P., Choudhary V., Christoffels A., Clutterbuck D. R., Crowe M. L., Dalla E., Dalrymple B. P., de Bono B., Della Gatta G., di Bernardo D., Down T., Engstrom P., Fagiolini M., Faulkner G., Fletcher C. F., Fukushima T., Furuno M., Futaki S., Gariboldi M., Georgii-Hemming P., Gingeras T. R., Gojobori T., Green R. E., Gustincich S., Harbers M., Hayashi Y., Hensch T. K., Hirokawa N., Hill D., Huminiecki L., Iacono M., Ikeo K., Iwama A., Ishikawa T., Jakt M., Kanapin A., Katoh M., Kawasaki Y., Kelso J., Kitamura H., Kitano H., Kollias G., Krishnan S. P., Kruger A., Kummerfeld S. K., Kurochkin I. V., Lareau L. F., Lazarevic D., Lipovich L., Liu J., Liuni S., McWilliam S., Madan Babu M., Madera M., Marchionni L., Matsuda H., Matsuzawa S., Miki H., Mignone F., Miyake S., Morris K., Mottagui-Tabar S., Mulder N., Nakano N., Nakauchi H., Ng P., Nilsson R., Nishiguchi S., Nishikawa S., et al. (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* **309**: 1559-63.
- Carpenter M. (1981). Anatomy of the corpus striatum and brainstem integrating systems. In "Handbook of Physiology, Section 1: The Nervous System", pp. 947-995, American physiological Society, Bethesda, Maryland.
- Carter R. J., Lione L. A., Humby T., Mangiarini L., Mahal A., Bates G. P., Dunnett S. B., and Morton A. J. (1999). Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* **19**: 3248-57.
- Cha J. H. (2007). Transcriptional signatures in Huntington's disease. *Prog Neurobiol*.
- Chabardes-Garonne D., Mejean A., Aude J. C., Cheval L., Di Stefano A., Gaillard M. C., Imbert-Teboul M., Wittner M., Balian C., Anthouard V., Robert C., Segurens B., Wincker P., Weissenbach J., Doucet A., and Elalouf J. M. (2003). A panoramic view of gene expression in the human kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13710-5.
- Chan E. Y., Luthi-Carter R., Strand A., Solano S. M., Hanson S. A., DeJohn M. M., Kooperberg C., Chase K. O., DiFiglia M., Young A. B., Leavitt B. R., Cha J. H., Aronin N., Hayden M. R., and Olson J. M. (2002). Increased huntingtin protein length reduces the number of polyglutamine-induced gene expression changes in mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **11**: 1939-51.
- Charrin B. C., Saudou F., and Humbert S. (2005). Axonal transport failure in neurodegenerative disorders: the case of Huntington's disease. *Pathol Biol (Paris)* **53**: 189-92.
- Charvin D., Vanhoutte P., Pages C., Borrelli E., and Caboche J. (2005). Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: The dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *PNAS* **102**: 12218-12223.
- Chattopadhyay B., Baksi K., Mukhopadhyay S., and Bhattacharyya N. P. (2005). Modulation of age at onset of Huntington disease patients by variations in TP53 and human caspase activated DNase (hCAD) genes. *Neurosci Lett* **374**: 81-6.
- Chattopadhyay B., Ghosh S., Gangopadhyay P. K., Das S. K., Roy T., Sinha K. K., Jha D. K., Mukherjee S. C., Chakraborty A., Singhal B. S., Bhattacharya A. K., and Bhattacharyya N. P. (2003). Modulation of age at onset in Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 2 patients originated from eastern India. *Neurosci Lett* **345**: 93-6.
- Chen J., Lee S., Zhou G., and Wang S. M. (2002). High-throughput GLGI procedure for converting a large number of serial analysis of gene expression tag sequences into 3' complementary DNAs. *Genes Chromosomes Cancer* **33**: 252-61.
- Cheng X. R., Zhou W. X., Zhang Y. X., Zhou D. S., Yang R. F., and Chen L. F. (2007). Differential gene expression profiles in the hippocampus of senescence-accelerated mouse. *Neurobiol Aging* **28**: 497-506.

- Chin (2007). A genome-scale map of expression for a mouse brain section obtained using voxelation. *Physiol Genomics*.
- Chiu V. K., Bivona T., Hach A., Sajous J. B., Silletti J., Wiener H., Johnson R. L., 2nd, Cox A. D., and Philips M. R. (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol* **4**: 343-50.
- Chomczynski P., and Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-9.
- Chrast R., Scott H. S., Papasavvas M. P., Rossier C., Antonarakis E. S., Barras C., Davisson M. T., Schmidt C., Estivill X., Dierssen M., Pritchard M., and Antonarakis S. E. (2000). The mouse brain transcriptome by SAGE: differences in gene expression between P30 brains of the partial trisomy 16 mouse model of Down syndrome (Ts65Dn) and normals. *Genome Res* **10**: 2006-21.
- Christiansen J. H., Yang Y., Venkataraman S., Richardson L., Stevenson P., Burton N., Baldock R. A., and Davidson D. R. (2006). EMAGE: a spatial database of gene expression patterns during mouse embryo development. *Nucleic Acids Res* **34**: D637-41.
- Christie M. J., Summers R. J., Stephenson J. A., Cook C. J., and Beart P. M. (1987). Excitatory amino acid projections to the nucleus accumbens septi in the rat: a retrograde transport study utilizing D[3H]aspartate and [3H]GABA. *Neuroscience* **22**: 425-39.
- Chu G., and Sharp P. A. (1981). A gene chimaera of SV40 and mouse beta-globin is transcribed and properly spliced. *Nature* **289**: 378-82.
- Chung C. Y., Seo H., Sonntag K. C., Brooks A., Lin L., and Isacson O. (2005). Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection. *Hum Mol Genet* **14**: 1709-25.
- Claing A., Chen W., Miller W. E., Vitale N., Moss J., Premont R. T., and Lefkowitz R. J. (2001). beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J Biol Chem* **276**: 42509-13.
- Clarke L., and Carbon J. (1976). A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. *Cell* **9**: 91-9.
- Cohen G. (1984). Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* **5**: 77-82.
- Cohen G. (2000). Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* **899**: 112-20.
- Cohen G. a. W., P (1994). Free radicals, oxidative stress, and neurodegeneration. In "Neurodegenerative diseases" (D. B. Clane, Ed.), pp. 139-161, W.B. Saunders, Philadelphia.
- Colomer V., Engelender S., Sharp A. H., Duan K., Cooper J. K., Lanahan A., Lyford G., Worley P., and Ross C. A. (1997). Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) binds to a Trio-like polypeptide, with a rac1 guanine nucleotide exchange factor domain. *Hum Mol Genet* **6**: 1519-25.
- Cossette M., Levesque M., and Parent A. (1999). Extrastriatal dopaminergic innervation of human basal ganglia. *Neurosci Res* **34**: 51-4.
- Cowan W. M., Gottlieb D. I., Hendrickson A. E., Price J. L., and Woolsey T. A. (1972). The autoradiographic demonstration of axonal connections in the central nervous system. *Brain Res* **37**: 21-51.
- Cowan W. M., and Powell T. P. (1956). A study of thalamo-striate relations in the monkey. *Brain* **79**: 364-90.
- Cummings C. J., Sun Y., Opal P., Antalffy B., Mestrlil R., Orr H. T., Dillmann W. H., and Zoghbi H. Y. (2001). Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses

- neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Hum Mol Genet* **10**: 1511-8.
- D'Agata V., and Cavallaro S. (2003). Hippocampal gene expression profiles in passive avoidance conditioning. *Eur J Neurosci* **18**: 2835-41.
- Dahlstrom A., and Fuxe K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* **20**: 398-9.
- Damodaran T. V., Patel A. G., Greenfield S. T., Dressman H. K., Lin S. M., and Abou-Donia M. B. (2006). Gene expression profiles of the rat brain both immediately and 3 months following acute sarin exposure. *Biochem Pharmacol* **71**: 497-520.
- Das U. N., and Vaddadi K. S. (2004). Essential fatty acids in Huntington's disease. *Nutrition* **20**: 942-7.
- Datson N. A., van der Perk-de Jong J., van den Berg M. P., de Kloet E. R., and Vreugdenhil E. (1999). MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. *Nucleic Acids Res* **27**: 1300-7.
- Datson N. A., van der Perk J., de Kloet E. R., and Vreugdenhil E. (2001). Expression profile of 30,000 genes in rat hippocampus using SAGE. *Hippocampus* **11**: 430-44.
- Dauer W., and Przedborski S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**: 889-909.
- Davies S. W., Turmaine M., Cozens B. A., DiFiglia M., Sharp A. H., Ross C. A., Scherzinger E., Wanker E. E., Mangiarini L., and Bates G. P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**: 537-48.
- de Almeida L. P., Ross C. A., Zala D., Aebischer P., and Deglon N. (2002). Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci* **22**: 3473-83.
- de Chaldee M., Brochier C., Van de Vel A., Caudy N., Luthi-Carter R., Gaillard M. C., and Elalouf J. M. (2006). Capucin: a novel striatal marker down-regulated in rodent models of Huntington disease. *Genomics* **87**: 200-7.
- de Chaldee M., Gaillard M. C., Bizat N., Buhler J. M., Manzoni O., Bockaert J., Hantraye P., Brouillet E., and Elalouf J. M. (2003). Quantitative assessment of transcriptome differences between brain territories. *Genome Res* **13**: 1646-53.
- de Chaldee M., Gaillard, M.C., and Elalouf, J.M (2005). Determining transcriptome differences between brain territories. In "SAGE: current technologies and applications" (S. M. Wang, Ed.), pp. 229-238, Horizon Bioscience, Norfolk.
- DeLong M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* **13**: 281-5.
- Dennis G., Jr., Sherman B. T., Hosack D. A., Yang J., Gao W., Lane H. C., and Lempicki R. A. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* **4**: P3.
- Deschenes M., Bourassa J., and Parent A. (1995). Two different types of thalamic fibers innervate the rat striatum. *Brain Res* **701**: 288-92.
- Desplats P. A., Kass K. E., Gilmartin T., Stanwood G. D., Woodward E. L., Head S. R., Sutcliffe J. G., and Thomas E. A. (2006). Selective deficits in the expression of striatal-enriched mRNAs in Huntington's disease. *J Neurochem* **96**: 743-57.
- Di Maio L., Squitieri F., Napolitano G., Campanella G., Trofatter J. A., and Conneally P. M. (1993). Suicide risk in Huntington's disease. *J Med Genet* **30**: 293-5.
- Dickey C. A., Loring J. F., Montgomery J., Gordon M. N., Eastman P. S., and Morgan D. (2003). Selectively reduced expression of synaptic plasticity-related genes in amyloid precursor protein + presenilin-1 transgenic mice. *J Neurosci* **23**: 5219-26.

- DiFiglia M. (1987). Synaptic organization of cholinergic neurons in the monkey neostriatum. *J Comp Neurol* **255**: 245-58.
- DiFiglia M., Pasik P., and Pasik T. (1976). A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res* **114**: 245-56.
- DiFiglia M., Sapp E., Chase K., Schwarz C., Meloni A., Young C., Martin E., Vonsattel J. P., Carraway R., Reeves S. A., and et al. (1995). Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* **14**: 1075-81.
- DiProspero N. A., Chen E. Y., Charles V., Plomann M., Kordower J. H., and Tagle D. A. (2004). Early changes in Huntington's disease patient brains involve alterations in cytoskeletal and synaptic elements. *J Neurocytol* **33**: 517-33.
- Divac I., Fonnum F., and Storm-Mathisen J. (1977). High affinity uptake of glutamate in terminals of corticostriatal axons. *Nature* **266**: 377-8.
- Dixon A. K., Richardson P. J., Lee K., Carter N. P., and Freeman T. C. (1998). Expression profiling of single cells using 3 prime end amplification (TPEA) PCR. *Nucleic Acids Res* **26**: 4426-31.
- Djousse L., Knowlton B., Hayden M. R., Almqvist E. W., Brinkman R. R., Ross C. A., Margolis R. L., Rosenblatt A., Durr A., Dode C., Morrison P. J., Novelletto A., Frontali M., Trent R. J., McCusker E., Gomez-Tortosa E., Mayo Cabrero D., Jones R., Zanko A., Nance M., Abramson R. K., Suchowersky O., Paulsen J. S., Harrison M. B., Yang Q., Cupples L. A., Mysore J., Gusella J. F., MacDonald M. E., and Myers R. H. (2004). Evidence for a modifier of onset age in Huntington disease linked to the HD gene in 4p16. *Neurogenetics* **5**: 109-14.
- Donaldson J. G. (2003). Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* **278**: 41573-6.
- Donoghue J. P., and Herkenham M. (1986). Neostriatal projections from individual cortical fields conform to histochemically distinct striatal compartments in the rat. *Brain Res* **365**: 397-403.
- Donoghue J. P., and Kitai S. T. (1981). A collateral pathway to the neostriatum from corticofugal neurons of the rat sensory-motor cortex: an intracellular HRP study. *J Comp Neurol* **201**: 1-13.
- Dube L., Smith A. D., and Bolam J. P. (1988). Identification of synaptic terminals of thalamic or cortical origin in contact with distinct medium-size spiny neurons in the rat neostriatum. *J Comp Neurol* **267**: 455-71.
- Emmert-Buck M. R., Bonner R. F., Smith P. D., Chuaqui R. F., Zhuang Z., Goldstein S. R., Weiss R. A., and Liotta L. A. (1996). Laser capture microdissection. *Science* **274**: 998-1001.
- English D., Cui Y., and Siddiqui R. A. (1996). Messenger functions of phosphatidic acid. *Chem Phys Lipids* **80**: 117-32.
- Fallon J. H., and Moore R. Y. (1978). Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* **180**: 545-80.
- Feldker D. E., Datson N. A., Veenema A. H., Meulmeester E., de Kloet E. R., and Vreugdenhil E. (2003). Serial analysis of gene expression predicts structural differences in hippocampus of long attack latency and short attack latency mice. *Eur J Neurosci* **17**: 379-87.
- Felten D. L., Laties A. M., and Carpenter M. B. (1974). Monoamine-containing cell bodies in the squirrel monkey brain. *Am J Anat* **139**: 153-65.
- Fernandez E., Schiappa R., Girault J. A., and Novere N. L. (2006). DARPP-32 Is a Robust Integrator of Dopamine and Glutamate Signals. *PLoS Comput Biol* **2**: e176.

- Figueredo-Cardenas G., Morello M., Sancesario G., Bernardi G., and Reiner A. (1996). Colocalization of somatostatin, neuropeptide Y, neuronal nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in striatal interneurons in rats. *Brain Res* **735**: 317-24.
- Folstein S. (1989). "Huntington's disease: a disorder of families," The Johns Hopkins University Press, Maryland.
- Fonnum F., Soreide A., Kvale I., Walker J., and Walaas I. (1981). Glutamate in cortical fibers. *Adv Biochem Psychopharmacol* **27**: 29-41.
- Francois C., Yelnik J., and Percheron G. (1987). Golgi study of the primate substantia nigra. II. Spatial organization of dendritic arborizations in relation to the cytoarchitectonic boundaries and to the striatonigral bundle. *J Comp Neurol* **265**: 473-93.
- Frohman M. A., Dush M. K., and Martin G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 8998-9002.
- Fudge J. L., Kunishio K., Walsh P., Richard C., and Haber S. N. (2002). Amygdaloid projections to ventromedial striatal subterritories in the primate. *Neuroscience* **110**: 257-75.
- Furuno M., Pang K. C., Ninomiya N., Fukuda S., Frith M. C., Bult C., Kai C., Kawai J., Carninci P., Hayashizaki Y., Mattick J. S., and Suzuki H. (2006). Clusters of internally primed transcripts reveal novel long noncoding RNAs. *PLoS Genet* **2**: e37.
- Galas M. C., Helms J. B., Vitale N., Thierse D., Aunis D., and Bader M. F. (1997). Regulated exocytosis in chromaffin cells. A potential role for a secretory granule-associated ARF6 protein. *J Biol Chem* **272**: 2788-93.
- Galleguillos D., Vecchiola A., Fuentealba J. A., Ojeda V., Alvarez K., Gomez A., and Andres M. E. (2004). PIASgamma represses the transcriptional activation induced by the nuclear receptor Nurr1. *J Biol Chem* **279**: 2005-11.
- Gasser T., Muller-Myhsok B., Wszolek Z. K., Oehlmann R., Calne D. B., Bonifati V., Bereznai B., Fabrizio E., Vieregge P., and Horstmann R. D. (1998). A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet* **18**: 262-5.
- Gauthier L. R., Charrin B. C., Borrell-Pages M., Dompierre J. P., Rangone H., Cordelieres F. P., De Mey J., MacDonald M. E., Lessmann V., Humbert S., and Saudou F. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* **118**: 127-38.
- Ge X., Jung Y. C., Wu Q., Kibbe W. A., and Wang S. M. (2006). Annotating nonspecific SAGE tags with microarray data. *Genomics* **87**: 173-80.
- Georgievska B., Kirik D., and Bjorklund A. (2002). Aberrant sprouting and downregulation of tyrosine hydroxylase in lesioned nigrostriatal dopamine neurons induced by long-lasting overexpression of glial cell line derived neurotrophic factor in the striatum by lentiviral gene transfer. *Exp Neurol* **177**: 461-74.
- Georgiou N., Bradshaw J. L., Chiu E., Tudor A., O'Gorman L., and Phillips J. G. (1999). Differential clinical and motor control function in a pair of monozygotic twins with Huntington's disease. *Mov Disord* **14**: 320-5.
- Georgopoulos M. D. a. A. (1981). Motor function of the basal ganglia. In "Handbook of Physiology, Section 1: The Nervous System", pp. 1017-1061, American physiological Society, Bethesda, Maryland.
- Gerfen C., and Wilson C. (1996). The basal ganglia. In "integrated systems of the CNS, Part III" (B. A. Swanson LW, Hökfelt T, Ed.), pp. 371-468, Elsevier Science, Amsterdam.
- Gerfen C. R. (1984). The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* **311**: 461-4.
- Gerfen C. R. (1989). The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science* **246**: 385-8.

- Gerfen C. R., Engber T. M., Mahan L. C., Susel Z., Chase T. N., Monsma F. J., Jr., and Sibley D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* **250**: 1429-32.
- Gerfen C. R., Herkenham M., and Thibault J. (1987). The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J Neurosci* **7**: 3915-34.
- Gerlach M., and Riederer P. (1996). Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm* **103**: 987-1041.
- Geschwind D. H., Perlman S., Figueroa C. P., Treiman L. J., and Pulst S. M. (1997a). The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* **60**: 842-50.
- Geschwind D. H., Perlman S., Figueroa K. P., Karrim J., Baloh R. W., and Pulst S. M. (1997b). Spinocerebellar ataxia type 6. Frequency of the mutation and genotype-phenotype correlations. *Neurology* **49**: 1247-51.
- Ghate A., Befort K., Becker J. A., Filliol D., Bole-Feysot C., Demebele D., Jost B., Koch M., and Kieffer B. L. (2007). Identification of novel striatal genes by expression profiling in adult mouse brain. *Neuroscience* **146**: 1182-92.
- Giasson B. I., Duda J. E., Murray I. V., Chen Q., Souza J. M., Hurtig H. I., Ischiropoulos H., Trojanowski J. Q., and Lee V. M. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* **290**: 985-9.
- Gimenez-Amaya J. M., McFarland N. R., de las Heras S., and Haber S. N. (1995). Organization of thalamic projections to the ventral striatum in the primate. *J Comp Neurol* **354**: 127-49.
- Ginsberg S. D., Hemby S. E., Lee V. M., Eberwine J. H., and Trojanowski J. Q. (2000). Expression profile of transcripts in Alzheimer's disease tangle-bearing CA1 neurons. *Ann Neurol* **48**: 77-87.
- Goffredo D., Rigamonti D., Tartari M., De Micheli A., Verderio C., Matteoli M., Zuccato C., and Cattaneo E. (2002). Calcium-dependent cleavage of endogenous wild-type huntingtin in primary cortical neurons. *J Biol Chem* **277**: 39594-8.
- Golbe L. I., Di Iorio G., Bonavita V., Miller D. C., and Duvoisin R. C. (1990). A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Ann Neurol* **27**: 276-82.
- Golbe L. I., Di Iorio G., Sanges G., Lazzarini A. M., La Sala S., Bonavita V., and Duvoisin R. C. (1996). Clinical genetic analysis of Parkinson's disease in the Contursi kindred. *Ann Neurol* **40**: 767-75.
- Gomez-Tortosa E., MacDonald M. E., Friend J. C., Taylor S. A., Weiler L. J., Cupples L. A., Srinidhi J., Gusella J. F., Bird E. D., Vonsattel J. P., and Myers R. H. (2001). Quantitative neuropathological changes in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol* **49**: 29-34.
- Gomez G. T., Hu H., McCaw E. A., and Denovan-Wright E. M. (2006). Brain-specific factors in combination with mutant huntingtin induce gene-specific transcriptional dysregulation. *Mol Cell Neurosci* **31**: 661-75.
- Gong S., Zheng C., Doughty M. L., Losos K., Didkovsky N., Schambra U. B., Nowak N. J., Joyner A., Leblanc G., Hatten M. E., and Heintz N. (2003). A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* **425**: 917-25.
- Gordon A. M., Quinn L., Reilmann R., and Marder K. (2000). Coordination of prehensile forces during precision grip in Huntington's disease. *Exp Neurol* **163**: 136-48.

- Gossler A., Joyner A. L., Rossant J., and Skarnes W. C. (1989). Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science* **244**: 463-5.
- Graham D. G. (1978). Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* **14**: 633-43.
- Gray P. A., Fu H., Luo P., Zhao Q., Yu J., Ferrari A., Tenzen T., Yuk D. I., Tsung E. F., Cai Z., Alberta J. A., Cheng L. P., Liu Y., Stenman J. M., Valerius M. T., Billings N., Kim H. A., Greenberg M. E., McMahon A. P., Rowitch D. H., Stiles C. D., and Ma Q. (2004). Mouse brain organization revealed through direct genome-scale TF expression analysis. *Science* **306**: 2255-7.
- Graybiel A. M., and Ragsdale C. W., Jr. (1978). Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 5723-6.
- Greenamyre J. T., Sherer T. B., Betarbet R., and Panov A. V. (2001). Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life* **52**: 135-41.
- Grunblatt E., Mandel S., Jacob-Hirsch J., Zeligson S., Amariglio N., Rechavi G., Li J., Ravid R., Roggendorf W., Riederer P., and Youdim M. B. (2004). Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta; alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes. *J Neural Transm* **111**: 1543-73.
- Grunblatt E., Mandel S., Maor G., and Youdim M. B. (2001). Gene expression analysis in N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice model of Parkinson's disease using cDNA microarray: effect of R-apomorphine. *J Neurochem* **78**: 1-12.
- Gunnensen J. M., Augustine C., Spirkoska V., Kim M., Brown M., and Tan S. S. (2002). Global analysis of gene expression patterns in developing mouse neocortex using serial analysis of gene expression. *Mol Cell Neurosci* **19**: 560-73.
- Gutekunst N. F. a. H. S. (2002). The neuropathology of Huntington's disease. In "Huntington's disease" (P. H. a. L. J. G Bates, Ed.), pp. 251-275, Oxford University Press, New York.
- Haber S. N., and Fudge J. L. (1997). The primate substantia nigra and VTA: integrative circuitry and function. *Crit Rev Neurobiol* **11**: 323-42.
- Haber S. N., Ryoo H., Cox C., and Lu W. (1995). Subsets of midbrain dopaminergic neurons in monkeys are distinguished by different levels of mRNA for the dopamine transporter: comparison with the mRNA for the D2 receptor, tyrosine hydroxylase and calbindin immunoreactivity. *J Comp Neurol* **362**: 400-10.
- Halliday G., Baker K., and Harper C. (1995). Serotonin and alcohol-related brain damage. *Metab Brain Dis* **10**: 25-30.
- Hansson O., Guatteo E., Mercuri N. B., Bernardi G., Li X. J., Castilho R. F., and Brundin P. (2001). Resistance to NMDA toxicity correlates with appearance of nuclear inclusions, behavioural deficits and changes in calcium homeostasis in mice transgenic for exon 1 of the huntington gene. *Eur J Neurosci* **14**: 1492-504.
- Harper P. (1991). Huntington's Disease, W.B. Saunders, London.
- Harper P. (2002). The epidemiology of Huntington's disease. In "Huntington's disease" (P. H. a. L. J. G Bates, Ed.), pp. 159-197, Oxford University Press, New York.
- Harris A. S., Denovan-Wright E. M., Hamilton L. C., and Robertson H. A. (2001). Protein kinase C beta II mRNA levels decrease in the striatum and cortex of transgenic Huntington's disease mice. *J Psychiatry Neurosci* **26**: 117-22.
- Hashimoto S. I., Suzuki T., Nagai S., Yamashita T., Toyoda N., and Matsushima K. (2000). Identification of genes specifically expressed in human activated and mature dendritic cells through serial analysis of gene expression. *Blood* **96**: 2206-14.

- Hastie N. D., and Bishop J. O. (1976). The expression of three abundance classes of messenger RNA in mouse tissues. *Cell* **9**: 761-74.
- Hauser M. A., Li Y. J., Xu H., Nouredine M. A., Shao Y. S., Gullans S. R., Scherzer C. R., Jensen R. V., McLaurin A. C., Gibson J. R., Scott B. L., Jewett R. M., Stenger J. E., Schmechel D. E., Hulette C. M., and Vance J. M. (2005). Expression profiling of substantia nigra in Parkinson disease, progressive supranuclear palsy, and frontotemporal dementia with parkinsonism. *Arch Neurol* **62**: 917-21.
- Hayden M. (1981). "Huntington's chorea," Springer, New York.
- Heimer L., and Wilson R. (1975). The subcortical projections to the allocortex: similarities in the neural associations of the hippocampus, the piriform cortex, and the neortex. In "Golgi Centennial Symposium: Perspectives in Neurobiology" (S. M, Ed.), pp. 173-197, Raven press, New York.
- Heinsen H., Rub U., Bauer M., Ulmar G., Bethke B., Schuler M., Bocker F., Eisenmenger W., Gotz M., Korr H., and Schmitz C. (1999). Nerve cell loss in the thalamic mediodorsal nucleus in Huntington's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* **97**: 613-22.
- Hely M. A., Morris J. G., Rail D., Reid W. G., O'Sullivan D. J., Williamson P. M., Genge S., and Broe G. A. (1989). The Sydney Multicentre Study of Parkinson's disease: a report on the first 3 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **52**: 324-8.
- Hemby S. E., Trojanowski J. Q., and Ginsberg S. D. (2003). Neuron-specific age-related decreases in dopamine receptor subtype mRNAs. *J Comp Neurol* **456**: 176-83.
- Herkenham M., and Pert C. B. (1981). Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature* **291**: 415-8.
- Hernan M. A., Takkouche B., Caamano-Isorna F., and Gestal-Otero J. J. (2002). A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* **52**: 276-84.
- Hernandez-Deviez D. J., Roth M. G., Casanova J. E., and Wilson J. M. (2004). ARNO and ARF6 regulate axonal elongation and branching through downstream activation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha. *Mol Biol Cell* **15**: 111-20.
- Hickey M. A., and Chesselet M. F. (2003). Apoptosis in Huntington's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**: 255-65.
- Hirsch E. C., Hoglinger G., Rousselet E., Breidert T., Parain K., Feger J., Ruberg M., Prigent A., Cohen-Salmon C., and Launay J. M. (2003). Animal models of Parkinson's disease in rodents induced by toxins: an update. *J Neural Transm Suppl*: 89-100.
- Hodges A., Strand A. D., Aragaki A. K., Kuhn A., Sengstag T., Hughes G., Elliston L. A., Hartog C., Goldstein D. R., Thu D., Hollingsworth Z. R., Collin F., Synek B., Holmans P. A., Young A. B., Wexler N. S., Delorenzi M., Kooperberg C., Augood S. J., Faull R. L., Olson J. M., Jones L., and Luthi-Carter R. (2006). Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum Mol Genet* **15**: 965-77.
- Hodgson J. G., Agopyan N., Gutekunst C. A., Leavitt B. R., LePiane F., Singaraja R., Smith D. J., Bissada N., McCutcheon K., Nasir J., Jamot L., Li X. J., Stevens M. E., Rosemond E., Roder J. C., Phillips A. G., Rubin E. M., Hersch S. M., and Hayden M. R. (1999). A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* **23**: 181-92.
- Hosack D. A., Dennis G., Jr., Sherman B. T., Lane H. C., and Lempicki R. A. (2003). Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* **4**: R70.
- Hovatta I., Zapala M. A., Broide R. S., Schadt E. E., Libiger O., Schork N. J., Lockhart D. J., and Barlow C. (2007). DNA variation and brain region-specific expression profiles

- exhibit different relationships between inbred mouse strains: implications for eQTL mapping studies. *Genome Biol* **8**: R25.
- Huang J., Mahavadi S., Sriwai W., Hu W., and Murthy K. S. (2006). Gi-coupled receptors mediate phosphorylation of CPI-17 and MLC20 via preferential activation of the PI3K/ILK pathway. *Biochem J* **396**: 193-200.
- Huff R. M. (1996). Signal transduction pathways modulated by the D2 subfamily of dopamine receptors. *Cell Signal* **8**: 453-9.
- Iannicola C., Moreno S., Oliverio S., Nardacci R., Ciofi-Luzzatto A., and Piacentini M. (2000). Early alterations in gene expression and cell morphology in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* **75**: 830-9.
- Ideker T., Thorsson V., Ranish J. A., Christmas R., Buhler J., Eng J. K., Bumgarner R., Goodlett D. R., Aebersold R., and Hood L. (2001). Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* **292**: 929-34.
- Ishii M., Hashimoto S., Tsutsumi S., Wada Y., Matsushima K., Kodama T., and Aburatani H. (2000). Direct comparison of GeneChip and SAGE on the quantitative accuracy in transcript profiling analysis. *Genomics* **68**: 136-43.
- Jackson-Lewis V., Jakowec M., Burke R. E., and Przedborski S. (1995). Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* **4**: 257-69.
- Javoy F., Sotelo C., Herbet A., and Agid Y. (1976). Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* **102**: 201-15.
- Jellinger K., Linert L., Kienzl E., Herlinger E., and Youdim M. B. (1995). Chemical evidence for 6-hydroxydopamine to be an endogenous toxic factor in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* **46**: 297-314.
- Jensen A. A., Pedersen U. B., Din N., and Andersen P. H. (1996). The dopamine D1 receptor family: structural and functional aspects. *Biochem Soc Trans* **24**: 163-9.
- Jeon B. S., Jackson-Lewis V., and Burke R. E. (1995). 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration* **4**: 131-7.
- Jeste D. V., Barban L., and Parisi J. (1984). Reduced Purkinje cell density in Huntington's disease. *Exp Neurol* **85**: 78-86.
- Jiang C. H., Tsien J. Z., Schultz P. G., and Hu Y. (2001). The effects of aging on gene expression in the hypothalamus and cortex of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1930-4.
- Jones P. H. a. L. (2002). Huntington's disease: genetic and molecular studies. In "Huntington's disease" (P. H. a. L. J. G Bates, Ed.), pp. 113-158, Oxford University Press, New York.
- Jongeneel C. V., Delorenzi M., Iseli C., Zhou D., Haudenschild C. D., Khrebtukova I., Kuznetsov D., Stevenson B. J., Strausberg R. L., Simpson A. J., and Vasicek T. J. (2005). An atlas of human gene expression from massively parallel signature sequencing (MPSS). *Genome Res* **15**: 1007-14.
- Kalivas P. W. (1985). Interactions between neuropeptides and dopamine neurons in the ventromedial mesencephalon. *Neurosci Biobehav Rev* **9**: 573-87.
- Kane M. D., Jatkoa T. A., Stumpf C. R., Lu J., Thomas J. D., and Madore S. J. (2000). Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res* **28**: 4552-7.
- Kapranov P., Cheng J., Dike S., Nix D. A., Duttagupta R., Willingham A. T., Stadler P. F., Hertel J., Hackermuller J., Hofacker I. L., Bell I., Cheung E., Drenkow J., Dumais E., Patel S., Helt G., Ganesh M., Ghosh S., Piccolboni A., Sementchenko V., Tammana

- H., and Gingeras T. R. (2007). RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* **316**: 1484-8.
- Katayama S., Tomaru Y., Kasukawa T., Waki K., Nakanishi M., Nakamura M., Nishida H., Yap C. C., Suzuki M., Kawai J., Suzuki H., Carninci P., Hayashizaki Y., Wells C., Frith M., Ravasi T., Pang K. C., Hallinan J., Mattick J., Hume D. A., Lipovich L., Batalov S., Engstrom P. G., Mizuno Y., Faghihi M. A., Sandelin A., Chalk A. M., Mottagui-Tabar S., Liang Z., Lenhard B., and Wahlestedt C. (2005). Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* **309**: 1564-6.
- Kawaguchi Y., Wilson C. J., and Emson P. C. (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* **10**: 3421-38.
- Kawasaki H., Springett G. M., Toki S., Canales J. J., Harlan P., Blumenstiel J. P., Chen E. J., Bany I. A., Mochizuki N., Ashbacher A., Matsuda M., Housman D. E., and Graybiel A. M. (1998). A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13278-83.
- Kehoe P., Krawczak M., Harper P. S., Owen M. J., and Jones A. L. (1999). Age of onset in Huntington disease: sex specific influence of apolipoprotein E genotype and normal CAG repeat length. *J Med Genet* **36**: 108-11.
- Kemp J. M., and Powell T. P. (1971). The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **262**: 383-401.
- Kempermann G., Wiskott L., and Gage F. H. (2004). Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* **14**: 186-91.
- Kent C. (1995). Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu Rev Biochem* **64**: 315-43.
- Khan N. L., Jain S., Lynch J. M., Pavese N., Abou-Sleiman P., Holton J. L., Healy D. G., Gilks W. P., Sweeney M. G., Ganguly M., Gibbons V., Gandhi S., Vaughan J., Eunsou L. H., Katzenschlager R., Gayton J., Lennox G., Revesz T., Nicholl D., Bhatia K. P., Quinn N., Brooks D., Lees A. J., Davis M. B., Piccini P., Singleton A. B., and Wood N. W. (2005). Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data. *Brain* **128**: 2786-96.
- Kim J. G., Armstrong R. C., v Agoston D., Robinsky A., Wiese C., Nagle J., and Hudson L. D. (1997). Myelin transcription factor 1 (Myt1) of the oligodendrocyte lineage, along with a closely related CCHC zinc finger, is expressed in developing neurons in the mammalian central nervous system. *J Neurosci Res* **50**: 272-90.
- Kita H., Kosaka T., and Heizmann C. W. (1990). Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res* **536**: 1-15.
- Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y., and Shimizu N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**: 605-8.
- Kitai S. T. (1981). Anatomy and physiology of the neostriatum. *Adv Biochem Psychopharmacol* **30**: 1-21.
- Kodzius R., Kojima M., Nishiyori H., Nakamura M., Fukuda S., Tagami M., Sasaki D., Imamura K., Kai C., Harbers M., Hayashizaki Y., and Carninci P. (2006). CAGE: cap analysis of gene expression. *Nat Methods* **3**: 211-22.
- Komure O., Sano A., Nishino N., Yamauchi N., Ueno S., Kondoh K., Sano N., Takahashi M., Murayama N., Kondo I., and et al. (1995). DNA analysis in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy: correlation between CAG repeat length and phenotypic variation and the molecular basis of anticipation. *Neurology* **45**: 143-9.
- Kopito R. R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* **10**: 524-30.

- Korneev S., and O'Shea M. (2005). Natural antisense RNAs in the nervous system. *Rev Neurosci* **16**: 213-22.
- Kremer B., Almqvist E., Theilmann J., Spence N., Telenius H., Goldberg Y. P., and Hayden M. R. (1995). Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. *Am J Hum Genet* **57**: 343-50.
- Kremer H. P. (1992). The hypothalamic lateral tuberal nucleus: normal anatomy and changes in neurological diseases. *Prog Brain Res* **93**: 249-61.
- Kremer H. P., Roos R. A., Dingjan G. M., Bots G. T., Bruyn G. W., and Hofman M. A. (1991). The hypothalamic lateral tuberal nucleus and the characteristics of neuronal loss in Huntington's disease. *Neurosci Lett* **132**: 101-4.
- Kruger R., Kuhn W., Muller T., Woitalla D., Graeber M., Kosel S., Przuntek H., Epplen J. T., Schols L., and Riess O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* **18**: 106-8.
- Kuhn K., Wellen J., Link N., Maskri L., Lubbert H., and Stichel C. C. (2003). The mouse MPTP model: gene expression changes in dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* **17**: 1-12.
- Kurosinski P., Guggisberg M., and Gotz J. (2002). Alzheimer's and Parkinson's disease--overlapping or synergistic pathologies? *Trends Mol Med* **8**: 3-5.
- Lambolez B., Audinat E., Bochet P., Crepel F., and Rossier J. (1992). AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* **9**: 247-58.
- Landles C., and Bates G. P. (2004). Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep* **5**: 958-63.
- Langston J. W., Ballard P., Tetrud J. W., and Irwin I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**: 979-80.
- Le Moine C., and Bloch B. (1991). Rat striatal and mesencephalic neurons contain the long isoform of the D2 dopamine receptor mRNA. *Brain Res Mol Brain Res* **10**: 283-9.
- Le Moine C., and Bloch B. (1995). D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol* **355**: 418-26.
- Le Moine C., and Bloch B. (1996). Expression of the D3 dopamine receptor in peptidergic neurons of the nucleus accumbens: comparison with the D1 and D2 dopamine receptors. *Neuroscience* **73**: 131-43.
- Le Moine C., Tison F., and Bloch B. (1990). D2 dopamine receptor gene expression by cholinergic neurons in the rat striatum. *Neurosci Lett* **117**: 248-52.
- Lee C. K., Weindruch R., and Prolla T. A. (2000a). Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet* **25**: 294-7.
- Lee C. S., Cenci M. A., Schulzer M., and Bjorklund A. (2000b). Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Brain* **123** (Pt 7): 1365-79.
- Lein E. S., Hawrylycz M. J., Ao N., Ayres M., Bensinger A., Bernard A., Boe A. F., Boguski M. S., Brockway K. S., Byrnes E. J., Chen L., Chen L., Chen T. M., Chin M. C., Chong J., Crook B. E., Czaplinska A., Dang C. N., Datta S., Dee N. R., Desaki A. L., Desta T., Diep E., Dolbeare T. A., Donelan M. J., Dong H. W., Dougherty J. G., Duncan B. J., Ebbert A. J., Eichele G., Estin L. K., Faber C., Facer B. A., Fields R., Fischer S. R., Fliss T. P., Frensley C., Gates S. N., Glattfelder K. J., Halverson K. R., Hart M. R., Hohmann J. G., Howell M. P., Jeung D. P., Johnson R. A., Karr P. T., Kawal R., Kidney J. M., Knapik R. H., Kuan C. L., Lake J. H., Laramée A. R., Larsen K. D., Lau C., Lemon T. A., Liang A. J., Liu Y., Luong L. T., Michaels J., Morgan J.

- J., Morgan R. J., Mortrud M. T., Mosqueda N. F., Ng L. L., Ng R., Orta G. J., Overly C. C., Pak T. H., Parry S. E., Pathak S. D., Pearson O. C., Puchalski R. B., Riley Z. L., Rockett H. R., Rowland S. A., Royall J. J., Ruiz M. J., Sarno N. R., Schaffnit K., Shapovalova N. V., Sivasay T., Slaughterbeck C. R., Smith S. C., Smith K. A., Smith B. I., Sodt A. J., Stewart N. N., Stumpf K. R., Sunkin S. M., Sutram M., Tam A., Teemer C. D., Thaller C., Thompson C. L., Varnam L. R., Visel A., Whitlock R. M., Wohnoutka P. E., Wolkey C. K., Wong V. Y., et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* **445**: 168-76.
- Leroy E., Boyer R., Auburger G., Leube B., Ulm G., Mezey E., Harta G., Brownstein M. J., Jonnalagada S., Chernova T., Dehejia A., Lavedan C., Gasser T., Steinbach P. J., Wilkinson K. D., and Polymeropoulos M. H. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* **395**: 451-2.
- Lesage S., Durr A., Tazir M., Lohmann E., Leutenegger A. L., Janin S., Pollak P., and Brice A. (2006). LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N Engl J Med* **354**: 422-3.
- Levitt P., Barbe M. F., and Eagleson K. L. (1997). Patterning and specification of the cerebral cortex. *Annu Rev Neurosci* **20**: 1-24.
- Lewis D., and Sesack S. (1997). Dopamine systems in the primate brain. In "Handbook of chemical neuroanatomy, Vol.13: The primate nervous system, Part I" (F. Bloom, Ed.), pp. 263-375, Elsevier.
- Li J., Waters S. B., Drobna Z., Devesa V., Styblo M., and Thomas D. J. (2005). Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the inorganic arsenic methylation phenotype. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**: 164-9.
- Li X. J., Li S. H., Sharp A. H., Nucifora F. C., Jr., Schilling G., Lanahan A., Worley P., Snyder S. H., and Ross C. A. (1995). A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* **378**: 398-402.
- Liao B. Y., and Zhang J. (2006). Low rates of expression profile divergence in highly expressed genes and tissue-specific genes during mammalian evolution. *Mol Biol Evol* **23**: 1119-28.
- Lickert H., Cox B., Wehrle C., Taketo M. M., Kemler R., and Rossant J. (2005). Dissecting Wnt/beta-catenin signaling during gastrulation using RNA interference in mouse embryos. *Development* **132**: 2599-609.
- Lindvall O., and Bjorklund A. (1974). The glyoxylic acid fluorescence histochemical method: a detailed account of the methodology for the visualization of central catecholamine neurons. *Histochemistry* **39**: 97-127.
- Lindvall O., and Bjorklund A. (1979). Dopaminergic innervation of the globus pallidus by collaterals from the nigrostriatal pathway. *Brain Res* **172**: 169-73.
- Lobo M. K., Karsten S. L., Gray M., Geschwind D. H., and Yang X. W. (2006). FACS-array profiling of striatal projection neuron subtypes in juvenile and adult mouse brains. *Nat Neurosci* **9**: 443-52.
- Lombroso P. J., Murdoch G., and Lerner M. (1991). Molecular characterization of a protein-tyrosine-phosphatase enriched in striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7242-6.
- Loring J. F., Wen X., Lee J. M., Seilhamer J., and Somogyi R. (2001). A gene expression profile of Alzheimer's disease. *DNA Cell Biol* **20**: 683-95.
- Lu B., Jiang Y. J., Zhou Y., Xu F. Y., Hatch G. M., and Choy P. C. (2005). Cloning and characterization of murine 1-acyl-sn-glycerol 3-phosphate acyltransferases and their regulation by PPARalpha in murine heart. *Biochem J* **385**: 469-77.
- Luesse H. G., Schiefer J., Spruenken A., Puls C., Block F., and Kosinski C. M. (2001). Evaluation of R6/2 HD transgenic mice for therapeutic studies in Huntington's

- disease: behavioral testing and impact of diabetes mellitus. *Behav Brain Res* **126**: 185-95.
- Lunkes A., and Mandel J. L. (1998). A cellular model that recapitulates major pathogenic steps of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **7**: 1355-61.
- Luthi-Carter R., Hanson S. A., Strand A. D., Bergstrom D. A., Chun W., Peters N. L., Woods A. M., Chan E. Y., Kooperberg C., Krainc D., Young A. B., Tapscott S. J., and Olson J. M. (2002a). Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Hum Mol Genet* **11**: 1911-26.
- Luthi-Carter R., Strand A., Peters N. L., Solano S. M., Hollingsworth Z. R., Menon A. S., Frey A. S., Spektor B. S., Penney E. B., Schilling G., Ross C. A., Borchelt D. R., Tapscott S. J., Young A. B., Cha J. H., and Olson J. M. (2000). Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **9**: 1259-71.
- Luthi-Carter R., Strand A. D., Hanson S. A., Kooperberg C., Schilling G., La Spada A. R., Merry D. E., Young A. B., Ross C. A., Borchelt D. R., and Olson J. M. (2002b). Polyglutamine and transcription: gene expression changes shared by DRPLA and Huntington's disease mouse models reveal context-independent effects. *Hum Mol Genet* **11**: 1927-37.
- Luthman J., Fredriksson A., Sundstrom E., Jonsson G., and Archer T. (1989). Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res* **33**: 267-77.
- Lynd-Balta E., and Haber S. N. (1994). The organization of midbrain projections to the ventral striatum in the primate. *Neuroscience* **59**: 609-23.
- MacDonald M. E., Vonsattel J. P., Shrinidhi J., Couropmitree N. N., Cupples L. A., Bird E. D., Gusella J. F., and Myers R. H. (1999). Evidence for the GluR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease. *Neurology* **53**: 1330-2.
- Macdonald V., and Halliday G. (2002). Pyramidal cell loss in motor cortices in Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **10**: 378-86.
- Macdonald V., Halliday G. M., Trent R. J., and McCusker E. A. (1997). Significant loss of pyramidal neurons in the angular gyrus of patients with Huntington's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**: 492-5.
- Magdaleno S., Jensen P., Brumwell C. L., Seal A., Lehman K., Asbury A., Cheung T., Cornelius T., Batten D. M., Eden C., Norland S. M., Rice D. S., Dosoooye N., Shakya S., Mehta P., and Curran T. (2006). BGEM: an in situ hybridization database of gene expression in the embryonic and adult mouse nervous system. *PLoS Biol* **4**: e86.
- Mahant N., McCusker E. A., Byth K., and Graham S. (2003). Huntington's disease: clinical correlates of disability and progression. *Neurology* **61**: 1085-92.
- Mangiarini L., Sathasivam K., Seller M., Cozens B., Harper A., Hetherington C., Lawton M., Trottier Y., Lehrach H., Davies S. W., and Bates G. P. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* **87**: 493-506.
- Margolis R. L., and Ross C. A. (2001). Expansion explosion: new clues to the pathogenesis of repeat expansion neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med* **7**: 479-82.
- Margulies M., Egholm M., Altman W. E., Attiya S., Bader J. S., Bemben L. A., Berka J., Braverman M. S., Chen Y. J., Chen Z., Dewell S. B., Du L., Fierro J. M., Gomes X. V., Godwin B. C., He W., Helgesen S., Ho C. H., Irzyk G. P., Jando S. C., Alenquer M. L., Jarvie T. P., Jirage K. B., Kim J. B., Knight J. R., Lanza J. R., Leamon J. H., Lefkowitz S. M., Lei M., Li J., Lohman K. L., Lu H., Makhijani V. B., McDade K. E., McKenna M. P., Myers E. W., Nickerson E., Nobile J. R., Plant R., Puc B. P., Ronan M. T., Roth G. T., Sarkis G. J., Simons J. F., Simpson J. W., Srinivasan M., Tartaro K.

- R., Tomasz A., Vogt K. A., Volkmer G. A., Wang S. H., Wang Y., Weiner M. P., Yu P., Begley R. F., and Rothberg J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**: 376-80.
- Maries E., Dass B., Collier T. J., Kordower J. H., and Steece-Collier K. (2003). The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nat Rev Neurosci* **4**: 727-38.
- Mariotti C., Castellotti B., Pareyson D., Testa D., Eoli M., Antozzi C., Silani V., Marconi R., Tezzon F., Siciliano G., Marchini C., Gellera C., and Donato S. D. (2000). Phenotypic manifestations associated with CAG-repeat expansion in the androgen receptor gene in male patients and heterozygous females: a clinical and molecular study of 30 families. *Neuromuscul Disord* **10**: 391-7.
- Marsden C. D. (1983). Neuromelanin and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* **19**: 121-41.
- Matsuki T., Hori G., and Furuichi T. (2005). Gene expression profiling during the embryonic development of mouse brain using an oligonucleotide-based microarray system. *Brain Res Mol Brain Res* **136**: 231-54.
- Matsumine H., Yamamura Y., Hattori N., Kobayashi T., Kitada T., Yoritaka A., and Mizuno Y. (1998). A microdeletion of D6S305 in a family of autosomal recessive juvenile parkinsonism (PARK2). *Genomics* **49**: 143-6.
- Matsumura H., Bin Nasir K. H., Yoshida K., Ito A., Kahl G., Kruger D. H., and Terauchi R. (2006). SuperSAGE array: the direct use of 26-base-pair transcript tags in oligonucleotide arrays. *Nat Methods* **3**: 469-74.
- Matsumura H., Reich S., Ito A., Saitoh H., Kamoun S., Winter P., Kahl G., Reuter M., Kruger D. H., and Terauchi R. (2003). Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15718-23.
- Maurice N., Deniau J. M., Glowinski J., and Thierry A. M. (1998). Relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat: physiology of the corticosubthalamic circuits. *J Neurosci* **18**: 9539-46.
- McGeer P. L., Itagaki S., Akiyama H., and McGeer E. G. (1988). Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann Neurol* **24**: 574-6.
- McGeorge A. J., and Faull R. L. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* **29**: 503-37.
- McNeil S. M., Novelletto A., Srinidhi J., Barnes G., Kornbluth I., Altherr M. R., Wasmuth J. J., Gusella J. F., MacDonald M. E., and Myers R. H. (1997). Reduced penetrance of the Huntington's disease mutation. *Hum Mol Genet* **6**: 775-9.
- Meade C. A., Deng Y. P., Fusco F. R., Del Mar N., Hersch S., Goldowitz D., and Reiner A. (2002). Cellular localization and development of neuronal intranuclear inclusions in striatal and cortical neurons in R6/2 transgenic mice. *J Comp Neurol* **449**: 241-69.
- Menalled L. B., and Chesselet M. F. (2002). Mouse models of Huntington's disease. *Trends Pharmacol Sci* **23**: 32-9.
- Menalled L. B., Sison J. D., Dragatsis I., Zeitlin S., and Chesselet M. F. (2003). Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J Comp Neurol* **465**: 11-26.
- Michiels E. M., Oussoren E., Van Groenigen M., Pauws E., Bossuyt P. M., Voute P. A., and Baas F. (1999). Genes differentially expressed in medulloblastoma and fetal brain. *Physiol Genomics* **1**: 83-91.
- Middleton F. A., Peng L., Lewis D. A., Levitt P., and Mirnics K. (2005). Altered expression of 14-3-3 genes in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **30**: 974-83.

- Miller J. J., Richardson T. L., Fibiger H. C., and McLennan H. (1975). Anatomical and electrophysiological identification of a projection from the mesencephalic raphe to the caudate-putamen in the rat. *Brain Res* **97**: 133-6.
- Miller R. M., Chen L. L., Kiser G. L., Giesler T. L., Kaysser-Kranich T. M., Palaniappan C., and Federoff H. J. (2005). Temporal evolution of mouse striatal gene expression following MPTP injury. *Neurobiol Aging* **26**: 765-75.
- Mills I. G., Gaughan L., Robson C., Ross T., McCracken S., Kelly J., and Neal D. E. (2005). Huntingtin interacting protein 1 modulates the transcriptional activity of nuclear hormone receptors. *J Cell Biol* **170**: 191-200.
- Mirnics K., Middleton F. A., Marquez A., Lewis D. A., and Levitt P. (2000). Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron* **28**: 53-67.
- Mirnics Z. K., Mirnics K., Terrano D., Lewis D. A., Sisodia S. S., and Schor N. F. (2003). DNA microarray profiling of developing PS1-deficient mouse brain reveals complex and coregulated expression changes. *Mol Psychiatry* **8**: 863-78.
- Mizuno H., Shibayama H., Tanaka F., Doyu M., Sobue G., Iwata H., Kobayashi H., Yamada K., Iwai K., Takeuchi T., Hashimoto N., Ishihara R., Ibuki Y., Ogasawara S., and Ozeki M. (2000). An autopsy case with clinically and molecular genetically diagnosed Huntington's disease with only minimal non-specific neuropathological findings. *Clin Neuropathol* **19**: 94-103.
- Modregger J., DiProspero N. A., Charles V., Tagle D. A., and Plomann M. (2002). PACSIN 1 interacts with huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains. *Hum Mol Genet* **11**: 2547-58.
- Mogenson G. J., Jones D. L., and Yim C. Y. (1980). From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* **14**: 69-97.
- Monsma F. J., Jr., Mahan L. C., McVittie L. D., Gerfen C. R., and Sibley D. R. (1990). Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 6723-7.
- Moore R. Y. (1978). Catecholamin innervation of the basal forebrain. I. The septal area. *J Comp Neurol* **177**: 665-84.
- Morgante L., Salemi G., Meneghini F., Di Rosa A. E., Epifanio A., Grigoletto F., Ragonese P., Patti F., Reggio A., Di Perri R., and Savettieri G. (2000). Parkinson disease survival: a population-based study. *Arch Neurol* **57**: 507-12.
- Mouradian M. M. (2002). Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurology* **58**: 179-85.
- Mrzljak L., Bergson C., Pappy M., Huff R., Levenson R., and Goldman-Rakic P. S. (1996). Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature* **381**: 245-8.
- Mufson E. J., Counts S. E., and Ginsberg S. D. (2002). Gene expression profiles of cholinergic nucleus basalis neurons in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* **27**: 1035-48.
- Mukai H., Isagawa T., Goyama E., Tanaka S., Bence N. F., Tamura A., Ono Y., and Kopito R. R. (2005). Formation of morphologically similar globular aggregates from diverse aggregation-prone proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10887-92.
- Murphy K. P., Carter R. J., Lione L. A., Mangiarini L., Mahal A., Bates G. P., Dunnett S. B., and Morton A. J. (2000). Abnormal synaptic plasticity and impaired spatial cognition in mice transgenic for exon 1 of the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* **20**: 5115-23.
- Myers R. H. (2004). Huntington's disease genetics. *NeuroRx* **1**: 255-62.

- Myers R. H., Vonsattel J. P., Paskevich P. A., Kiely D. K., Stevens T. J., Cupples L. A., Richardson E. P., Jr., and Bird E. D. (1991). Decreased neuronal and increased oligodendroglial densities in Huntington's disease caudate nucleus. *J Neuropathol Exp Neurol* **50**: 729-42.
- Nacht M., Ferguson A. T., Zhang W., Petroziello J. M., Cook B. P., Gao Y. H., Maguire S., Riley D., Coppola G., Landes G. M., Madden S. L., and Sukumar S. (1999). Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Res* **59**: 5464-70.
- Nakada M., Yamada A., Takino T., Miyamori H., Takahashi T., Yamashita J., and Sato H. (2001). Suppression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 activation and tumor invasion by testican 3 and its splicing variant gene product, N-Tes. *Cancer Res* **61**: 8896-902.
- Nakano K., Hasegawa Y., Tokushige A., Nakagawa S., Kayahara T., and Mizuno N. (1990). Topographical projections from the thalamus, subthalamic nucleus and pedunculopontine tegmental nucleus to the striatum in the Japanese monkey, *Macaca fuscata*. *Brain Res* **537**: 54-68.
- Nambu A., Takada M., Inase M., and Tokuno H. (1996). Dual somatotopical representations in the primate subthalamic nucleus: evidence for ordered but reversed body-map transformations from the primary motor cortex and the supplementary motor area. *J Neurosci* **16**: 2671-83.
- Napolitano M., Centonze D., Calce A., Picconi B., Spiezia S., Gulino A., Bernardi G., and Calabresi P. (2002). Experimental parkinsonism modulates multiple genes involved in the transduction of dopaminergic signals in the striatum. *Neurobiol Dis* **10**: 387-95.
- Neilson L., Andalibi A., Kang D., Coutifaris C., Strauss J. F., 3rd, Stanton J. A., and Green D. P. (2000). Molecular phenotype of the human oocyte by PCR-SAGE. *Genomics* **63**: 13-24.
- Nicklas W. J., Youngster S. K., Kindt M. V., and Heikkila R. E. (1987). MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci* **40**: 721-9.
- Nobin A., and Bjorklund A. (1973). Topography of the monoamine neuron systems in the human brain as revealed in fetuses. *Acta Physiol Scand Suppl* **388**: 1-40.
- Noda K. (1968). Differences in Na and Ca ion effluxes between the cell portion and the fibre portion in the spinal ganglion-root preparation obtained from the bullfrog. *Kurume Med J* **15**: 1-14.
- Noureddine M. A., Li Y. J., van der Walt J. M., Walters R., Jewett R. M., Xu H., Wang T., Walter J. W., Scott B. L., Hulette C., Schmechel D., Stenger J. E., Dietrich F., Vance J. M., and Hauser M. A. (2005). Genomic convergence to identify candidate genes for Parkinson disease: SAGE analysis of the substantia nigra. *Mov Disord* **20**: 1299-309.
- O'Hearn E., Holmes S. E., Calvert P. C., Ross C. A., and Margolis R. L. (2001). SCA-12: Tremor with cerebellar and cortical atrophy is associated with a CAG repeat expansion. *Neurology* **56**: 299-303.
- Ohtsuka T., Nakanishi H., Ikeda W., Satoh A., Momose Y., Nishioka H., and Takai Y. (1998). Nexilin: a novel actin filament-binding protein localized at cell-matrix adherens junction. *J Cell Biol* **143**: 1227-38.
- Olpe H. R., and Koella W. P. (1977). The response of striatal cells upon stimulation of the dorsal and median raphe nuclei. *Brain Res* **122**: 357-60.
- Panov A. V., Burke J. R., Strittmatter W. J., and Greenamyre J. T. (2003). In vitro effects of polyglutamine tracts on Ca²⁺-dependent depolarization of rat and human mitochondria: relevance to Huntington's disease. *Arch Biochem Biophys* **410**: 1-6.

- Papadimitriou A., Veletza V., Hadjigeorgiou G. M., Patrikiou A., Hirano M., and Anastasopoulos I. (1999). Mutated alpha-synuclein gene in two Greek kindreds with familial PD: incomplete penetrance? *Neurology* **52**: 651-4.
- Pardo R., Colin E., Regulier E., Aebischer P., Deglon N., Humbert S., and Saudou F. (2006). Inhibition of calcineurin by FK506 protects against polyglutamine-huntingtin toxicity through an increase of huntingtin phosphorylation at S421. *J Neurosci* **26**: 1635-45.
- Parent A. (1986). "Comparative neurobiology of the basal ganglia," New York.
- Parent A., and Hazrati L. N. (1995a). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* **20**: 91-127.
- Parent A., and Hazrati L. N. (1995b). Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* **20**: 128-54.
- Parent A., Sato F., Wu Y., Gauthier J., Levesque M., and Parent M. (2000). Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization. *Trends Neurosci* **23**: S20-7.
- Paulsen J. S., Hoth K. F., Nehl C., and Stierman L. (2005). Critical periods of suicide risk in Huntington's disease. *Am J Psychiatry* **162**: 725-31.
- Paxinos G. (2004). "The rat nervous system, Third Edition," Elsevier Academic Press.
- Paxinos G., and Franklin, K.B.J (2001). "The mouse brain in stereotaxic coordinates," Academic Press, San Diego.
- Peters D. G., Kassam A. B., Yonas H., O'Hare E. H., Ferrell R. E., and Brufsky A. M. (1999a). Comprehensive transcript analysis in small quantities of mRNA by SAGE-lite. *Nucleic Acids Res* **27**: e39.
- Peters M. F., Nucifora F. C., Jr., Kushi J., Seaman H. C., Cooper J. K., Herring W. J., Dawson V. L., Dawson T. M., and Ross C. A. (1999b). Nuclear targeting of mutant Huntingtin increases toxicity. *Mol Cell Neurosci* **14**: 121-8.
- Petersen A., Gil J., Maat-Schieman M. L., Bjorkqvist M., Tanila H., Araujo I. M., Smith R., Popovic N., Wierup N., Norlen P., Li J. Y., Roos R. A., Sundler F., Mulder H., and Brundin P. (2005). Orexin loss in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **14**: 39-47.
- Petersen A., Larsen K. E., Behr G. G., Romero N., Przedborski S., Brundin P., and Sulzer D. (2001). Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum Mol Genet* **10**: 1243-54.
- Piccioni F., Simeoni S., Andriola I., Armatura E., Bassanini S., Pozzi P., and Poletti A. (2001). Polyglutamine tract expansion of the androgen receptor in a motoneuronal model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Brain Res Bull* **56**: 215-20.
- Polymeropoulos M. H., Lavedan C., Leroy E., Ide S. E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E. S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W. G., Lazzarini A. M., Duvoisin R. C., Di Iorio G., Golbe L. I., and Nussbaum R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **276**: 2045-7.
- Popesco M. C., Lin S., Wang Z., Ma Z. J., Friedman L., Frosthalm A., and Rotter A. (2007). Serial analysis of gene expression profiles of adult and aged mouse cerebellum. *Neurobiol Aging*.
- Powell T. P., and Cowan W. M. (1954). The connexions of the midline and intralaminar nuclei of the thalamus of the rat. *J Anat* **88**: 307-19.
- Pridmore S. A. (1990). The large Huntington's disease family of Tasmania. *Med J Aust* **153**: 593-5.

- Prolla T. A., and Mattson M. P. (2001). Molecular mechanisms of brain aging and neurodegenerative disorders: lessons from dietary restriction. *Trends Neurosci* **24**: S21-31.
- Przedborski S., Jackson-Lewis V., Naini A. B., Jakowec M., Petzinger G., Miller R., and Akram M. (2001). The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem* **76**: 1265-74.
- Pulst S. (2003). "Genetics of movement disorders," Academic Press, California.
- Rajeevan M. S., Vernon S. D., Taysavang N., and Unger E. R. (2001). Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Mol Diagn* **3**: 26-31.
- Ranen N. G., Stine O. C., Abbott M. H., Sherr M., Codori A. M., Franz M. L., Chao N. I., Chung A. S., Pleasant N., Callahan C., and et al. (1995). Anticipation and instability of IT-15 (CAG)_n repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *Am J Hum Genet* **57**: 593-602.
- Rangone H., Humbert S., and Saudou F. (2004). Huntington's disease: how does huntingtin, an anti-apoptotic protein, become toxic? *Pathol Biol (Paris)* **52**: 338-42.
- Ren B., Robert F., Wyrick J. J., Aparicio O., Jennings E. G., Simon I., Zeitlinger J., Schreiber J., Hannett N., Kanin E., Volkert T. L., Wilson C. J., Bell S. P., and Young R. A. (2000). Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* **290**: 2306-9.
- Richfield E. K., Maguire-Zeiss K. A., Cox C., Gilmore J., and Voorn P. (1995). Reduced expression of preproenkephalin in striatal neurons from Huntington's disease patients. *Ann Neurol* **37**: 335-43.
- Robins Wahlin T. B., Backman L., Lundin A., Haegermark A., Winblad B., and Anvret M. (2000). High suicidal ideation in persons testing for Huntington's disease. *Acta Neurol Scand* **102**: 150-61.
- Rocha M. E., Ferreira A. M., and Bechara E. J. (2000). Roles of phosphate and an enoyl radical in ferritin iron mobilization by 5-aminolevulinic acid. *Free Radic Biol Med* **29**: 1272-9.
- Rosas H. D., Koroshetz W. J., Chen Y. I., Skeuse C., Vangel M., Cudkowicz M. E., Caplan K., Marek K., Seidman L. J., Makris N., Jenkins B. G., and Goldstein J. M. (2003). Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology* **60**: 1615-20.
- Rosenblatt A., Brinkman R. R., Liang K. Y., Almqvist E. W., Margolis R. L., Huang C. Y., Sherr M., Franz M. L., Abbott M. H., Hayden M. R., and Ross C. A. (2001). Familial influence on age of onset among siblings with Huntington disease. *Am J Med Genet* **105**: 399-403.
- Rubinsztein D. (2003). biology of Huntington's disease (HD) and HD-like disorders. In "Genetics of movement disorders" (S. Pulst, Ed.), pp. 365-377, Academic Press, California.
- Rubinsztein D. C., Leggo J., Coles R., Almqvist E., Biancalana V., Cassiman J. J., Chotai K., Connarty M., Crauford D., Curtis A., Curtis D., Davidson M. J., Differ A. M., Dode C., Dodge A., Frontali M., Ranen N. G., Stine O. C., Sherr M., Abbott M. H., Franz M. L., Graham C. A., Harper P. S., Hedreen J. C., Hayden M. R., and et al. (1996). Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet* **59**: 16-22.
- Saha S., Sparks A. B., Rago C., Akmaev V., Wang C. J., Vogelstein B., Kinzler K. W., and Velculescu V. E. (2002). Using the transcriptome to annotate the genome. *Nat Biotechnol* **20**: 508-12.

- Sanberg P. R., and Coyle J. T. (1984). Scientific approaches to Huntington's disease. *CRC Crit Rev Clin Neurobiol* **1**: 1-44.
- Sanchez I., Xu C. J., Juo P., Kakizaka A., Blenis J., and Yuan J. (1999). Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* **22**: 623-33.
- Sandberg R., Yasuda R., Pankratz D. G., Carter T. A., Del Rio J. A., Wodicka L., Mayford M., Lockhart D. J., and Barlow C. (2000). Regional and strain-specific gene expression mapping in the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11038-43.
- Sarre S., Yuan H., Jonkers N., Van Hemelrijck A., Ebinger G., and Michotte Y. (2004). In vivo characterization of somatodendritic dopamine release in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurochem* **90**: 29-39.
- Saudou F., Finkbeiner S., Devys D., and Greenberg M. E. (1998). Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* **95**: 55-66.
- Sauer H., and Oertel W. H. (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* **59**: 401-15.
- Schena M., Shalon D., Davis R. W., and Brown P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**: 467-70.
- Schena M., Shalon D., Heller R., Chai A., Brown P. O., and Davis R. W. (1996). Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10614-9.
- Schiller M. R., Mains R. E., and Eipper B. A. (1997). A novel neuroendocrine intracellular signaling pathway. *Mol Endocrinol* **11**: 1846-57.
- Schmidt N., and Ferger B. (2001). Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm* **108**: 1263-82.
- Schmitt A., Asan E., Puschel B., and Kugler P. (1997). Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *J Neurosci* **17**: 1-10.
- Schober A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* **318**: 215-24.
- Schroder A. R., Shinn P., Chen H., Berry C., Ecker J. R., and Bushman F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**: 521-9.
- Sedelis M., Schwarting R. K., and Huston J. P. (2001). Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* **125**: 109-25.
- Shimura H., Schlossmacher M. G., Hattori N., Frosch M. P., Trockenbacher A., Schneider R., Mizuno Y., Kosik K. S., and Selkoe D. J. (2001). Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* **293**: 263-9.
- Shiraki T., Kondo S., Katayama S., Waki K., Kasukawa T., Kawaji H., Kodzius R., Watahiki A., Nakamura M., Arakawa T., Fukuda S., Sasaki D., Podhajska A., Harbers M., Kawai J., Carninci P., and Hayashizaki Y. (2003). Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15776-81.
- Siddiqui A. S., Khattra J., Delaney A. D., Zhao Y., Astell C., Asano J., Babakaiff R., Barber S., Beland J., Bohacec S., Brown-John M., Chand S., Charest D., Charters A. M., Cullum R., Dhalla N., Featherstone R., Gerhard D. S., Hoffman B., Holt R. A., Hou J., Kuo B. Y., Lee L. L., Lee S., Leung D., Ma K., Matsuo C., Mayo M., McDonald H., Prabhu A. L., Pandoh P., Riggins G. J., de Algara T. R., Rupert J. L., Smailus D., Stott

- J., Tsai M., Varhol R., Vrljicak P., Wong D., Wu M. K., Xie Y. Y., Yang G., Zhang I., Hirst M., Jones S. J., Helgason C. D., Simpson E. M., Hoodless P. A., and Marra M. A. (2005). A mouse atlas of gene expression: large-scale digital gene-expression profiles from precisely defined developing C57BL/6J mouse tissues and cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18485-90.
- Sidibe M., Bevan M. D., Bolam J. P., and Smith Y. (1997). Efferent connections of the internal globus pallidus in the squirrel monkey: I. Topography and synaptic organization of the pallidothalamic projection. *J Comp Neurol* **382**: 323-47.
- Singleton A. B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R., Lincoln S., Crawley A., Hanson M., Maraganore D., Adler C., Cookson M. R., Muentner M., Baptista M., Miller D., Blancato J., Hardy J., and Gwinn-Hardy K. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* **302**: 841.
- Siu I. M., Lal A., and Riggins G. J. (2001). A database for regional gene expression in the human brain. *Brain Res Gene Expr Patterns* **1**: 33-8.
- Skarnes W. C., Auerbach B. A., and Joyner A. L. (1992). A gene trap approach in mouse embryonic stem cells: the lacZ reported is activated by splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice. *Genes Dev* **6**: 903-18.
- Smith Y., Parent A., Seguela P., and Descarries L. (1987). Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the basal ganglia of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Comp Neurol* **259**: 50-64.
- Snider B. J., Moss J. L., Revilla F. J., Lee C. S., Wheeler V. C., Macdonald M. E., and Choi D. W. (2003). Neocortical neurons cultured from mice with expanded CAG repeats in the huntingtin gene: unaltered vulnerability to excitotoxins and other insults. *Neuroscience* **120**: 617-25.
- Snowden J. S., Craufurd D., Thompson J., and Neary D. (2002). Psychomotor, executive, and memory function in preclinical Huntington's disease. *J Clin Exp Neuropsychol* **24**: 133-45.
- Son C. G., Bilke S., Davis S., Greer B. T., Wei J. S., Whiteford C. C., Chen Q. R., Cenacchi N., and Khan J. (2005). Database of mRNA gene expression profiles of multiple human organs. *Genome Res* **15**: 443-50.
- Sonsalla P. K., and Heikkila R. E. (1986). The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *Eur J Pharmacol* **129**: 339-45.
- Sorensen S. A., Fenger K., and Olsen J. H. (1999). Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease: An apoptotic effect of an expanded polyglutamine tract? *Cancer* **86**: 1342-6.
- Spargo E., Everall I. P., and Lantos P. L. (1993). Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **56**: 487-91.
- Splinter P. L., Lazaridis K. N., Dawson P. A., and LaRusso N. F. (2006). Cloning and expression of SLC10A4, a putative organic anion transport protein. *World J Gastroenterol* **12**: 6797-805.
- Springett G. M., Bonham L., Hummer A., Linkov I., Misra D., Ma C., Pezzoni G., Di Giovine S., Singer J., Kawasaki H., Spriggs D., Soslow R., and Dupont J. (2005). Lysophosphatidic acid acyltransferase-beta is a prognostic marker and therapeutic target in gynecologic malignancies. *Cancer Res* **65**: 9415-25.
- Squitieri F., Cannella M., and Simonelli M. (2002). CAG mutation effect on rate of progression in Huntington's disease. *Neurol Sci* **23 Suppl 2**: S107-8.
- Squitieri F., Gellera C., Cannella M., Mariotti C., Cislighi G., Rubinsztein D. C., Almqvist E. W., Turner D., Bachoud-Levi A. C., Simpson S. A., Delatycki M., Maglione V.,

- Hayden M. R., and Donato S. D. (2003). Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain* **126**: 946-55.
- Stansberg C., Vik-Mo A. O., Holdhus R., Breilid H., Srebro B., Petersen K., Jorgensen H. A., Jonassen I., and Steen V. M. (2007). Gene expression profiles in rat brain disclose CNS signature genes and regional patterns of functional specialisation. *BMC Genomics* **8**: 94.
- Steffensen S. C., Svingos A. L., Pickel V. M., and Henriksen S. J. (1998). Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* **18**: 8003-15.
- Stevanin G., Durr A., and Brice A. (2000). Clinical and molecular advances in autosomal dominant cerebellar ataxias: from genotype to phenotype and physiopathology. *Eur J Hum Genet* **8**: 4-18.
- Strand A. D., Aragaki A. K., Baquet Z. C., Hodges A., Cunningham P., Holmans P., Jones K. R., Jones L., Kooperberg C., and Olson J. M. (2007). Conservation of Regional Gene Expression in Mouse and Human Brain. *PLoS Genet* **3**: e59.
- Su A. I., Wiltshire T., Batalov S., Lapp H., Ching K. A., Block D., Zhang J., Soden R., Hayakawa M., Kreiman G., Cooke M. P., Walker J. R., and Hogenesch J. B. (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6062-7.
- Sudhof T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **27**: 509-47.
- Sugars K. L., and Rubinstein D. C. (2003). Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet* **19**: 233-8.
- Sugino K., Hempel C. M., Miller M. N., Hattox A. M., Shapiro P., Wu C., Huang Z. J., and Nelson S. B. (2006). Molecular taxonomy of major neuronal classes in the adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* **9**: 99-107.
- Suzuki H., Okunishi R., Hashizume W., Katayama S., Ninomiya N., Osato N., Sato K., Nakamura M., Iida J., Kanamori M., and Hayashizaki Y. (2004). Identification of region-specific transcription factor genes in the adult mouse brain by medium-scale real-time RT-PCR. *FEBS Lett* **573**: 214-8.
- Szabo J. (1970). Projections from the body of the caudate nucleus in the rhesus monkey. *Exp Neurol* **27**: 1-15.
- Taira T., Saito Y., Niki T., Iguchi-Ariga S. M., Takahashi K., and Ariga H. (2004). DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* **5**: 213-8.
- Takai Y., Shimizu K., and Ohtsuka T. (2003). The roles of cadherins and nectins in interneuronal synapse formation. *Curr Opin Neurobiol* **13**: 520-6.
- Takano H., Cancel G., Ikeuchi T., Lorenzetti D., Mawad R., Stevanin G., Didierjean O., Durr A., Oyake M., Shimohata T., Sasaki R., Koide R., Igarashi S., Hayashi S., Takiyama Y., Nishizawa M., Tanaka H., Zoghbi H., Brice A., and Tsuji S. (1998). Close associations between prevalences of dominantly inherited spinocerebellar ataxias with CAG-repeat expansions and frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations. *Am J Hum Genet* **63**: 1060-6.
- Tang W., Yuan J., Chen X., Gu X., Luo K., Li J., Wan B., Wang Y., and Yu L. (2006). Identification of a novel human lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT-theta, which activates mTOR pathway. *J Biochem Mol Biol* **39**: 626-35.
- Tanner C. M. (1992). Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin* **10**: 317-29.
- Tatton N. A., and Kish S. J. (1997). In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience* **77**: 1037-48.

- Tepper J. M., Sun B. C., Martin L. P., and Creese I. (1997). Functional roles of dopamine D2 and D3 autoreceptors on nigrostriatal neurons analyzed by antisense knockdown in vivo. *J Neurosci* **17**: 2519-30.
- Thorner G., Lange H., and Hopf A. (1975). [Morphometrical-statistical structure analysis of human striatum, pallidus and subthalamic nucleus. II. Globus pallidus]. *J Hirnforsch* **16**: 401-13.
- Thuret S., Bhatt L., O'Leary D. D., and Simon H. H. (2004). Identification and developmental analysis of genes expressed by dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta. *Mol Cell Neurosci* **25**: 394-405.
- Tkachev D., Mimmack M. L., Ryan M. M., Wayland M., Freeman T., Jones P. B., Starkey M., Webster M. J., Yolken R. H., and Bahn S. (2003). Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet* **362**: 798-805.
- Torres-Munoz J. E., Van Waveren C., Keegan M. G., Bookman R. J., and Petito C. K. (2004). Gene expression profiles in microdissected neurons from human hippocampal subregions. *Brain Res Mol Brain Res* **127**: 105-14.
- Trettel F., Rigamonti D., Hilditch-Maguire P., Wheeler V. C., Sharp A. H., Persichetti F., Cattaneo E., and MacDonald M. E. (2000). Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells. *Hum Mol Genet* **9**: 2799-809.
- Trottier Y., Biancalana V., and Mandel J. L. (1994). Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset. *J Med Genet* **31**: 377-82.
- Turmaine M., Raza A., Mahal A., Mangiarini L., Bates G. P., and Davies S. W. (2000). Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8093-7.
- Uhl G. R., Walther D., Mash D., Faucheux B., and Javoy-Agid F. (1994). Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons. *Ann Neurol* **35**: 494-8.
- Ungerstedt U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* **5**: 107-10.
- Vaddadi K. (1996). Dyskinesias and their treatment with essential fatty acids: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **55**: 89-94.
- Valente E. M., Abou-Sleiman P. M., Caputo V., Muqit M. M., Harvey K., Gispert S., Ali Z., Del Turco D., Bentivoglio A. R., Healy D. G., Albanese A., Nussbaum R., Gonzalez-Maldonado R., Deller T., Salvi S., Cortelli P., Gilks W. P., Latchman D. S., Harvey R. J., Dallapiccola B., Auburger G., and Wood N. W. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **304**: 1158-60.
- van Dellen A., Welch J., Dixon R. M., Cordery P., York D., Styles P., Blakemore C., and Hannan A. J. (2000). N-Acetylaspartate and DARPP-32 levels decrease in the corpus striatum of Huntington's disease mice. *Neuroreport* **11**: 3751-7.
- van Duijn C. M., Dekker M. C., Bonifati V., Galjaard R. J., Houwing-Duistermaat J. J., Snijders P. J., Testers L., Breedveld G. J., Horstink M., Sandkuijl L. A., van Swieten J. C., Oostra B. A., and Heutink P. (2001). Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet* **69**: 629-34.
- Van Gelder R. N., von Zastrow M. E., Yool A., Dement W. C., Barchas J. D., and Eberwine J. H. (1990). Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1663-7.
- Vawter M. P., Shannon Weickert C., Ferran E., Matsumoto M., Overman K., Hyde T. M., Weinberger D. R., Bunney W. E., and Kleinman J. E. (2004). Gene expression of

- metabolic enzymes and a protease inhibitor in the prefrontal cortex are decreased in schizophrenia. *Neurochem Res* **29**: 1245-55.
- Velculescu V. E., Zhang L., Vogelstein B., and Kinzler K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* **270**: 484-7.
- Velculescu V. E., Zhang L., Zhou W., Vogelstein J., Basrai M. A., Bassett D. E., Jr., Hieter P., Vogelstein B., and Kinzler K. W. (1997). Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* **88**: 243-51.
- Vergnes L., Beigneux A. P., Davis R., Watkins S. M., Young S. G., and Reue K. (2006). Agpat6 deficiency causes subdermal lipodystrophy and resistance to obesity. *J Lipid Res* **47**: 745-54.
- Vila M., and Przedborski S. (2004). Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med* **10 Suppl**: S58-62.
- Vila M., Vukosavic S., Jackson-Lewis V., Neystat M., Jakowec M., and Przedborski S. (2000). Alpha-synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP. *J Neurochem* **74**: 721-9.
- Vilain C., Libert F., Venet D., Costagliola S., and Vassart G. (2003). Small amplified RNA-SAGE: an alternative approach to study transcriptome from limiting amount of mRNA. *Nucleic Acids Res* **31**: e24.
- Virlon B., Cheval L., Buhler J. M., Billon E., Doucet A., and Elalouf J. M. (1999). Serial microanalysis of renal transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15286-91.
- Visel A., Thaller C., and Eichele G. (2004). GenePaint.org: an atlas of gene expression patterns in the mouse embryo. *Nucleic Acids Res* **32**: D552-6.
- Vogt C., and Vogt O. (1920). Zur Lehre der Erkrankungen des striären Systems. *Z Psychol Neurol* **25**: 627-846.
- von Melchner H., DeGregori J. V., Rayburn H., Reddy S., Friedel C., and Ruley H. E. (1992). Selective disruption of genes expressed in totipotent embryonal stem cells. *Genes Dev* **6**: 919-27.
- Vonsattel J. P., and DiFiglia M. (1998). Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**: 369-84.
- Voorn P., Gerfen C. R., and Groenewegen H. J. (1989). Compartmental organization of the ventral striatum of the rat: immunohistochemical distribution of enkephalin, substance P, dopamine, and calcium-binding protein. *J Comp Neurol* **289**: 189-201.
- Waterston R. H., Lindblad-Toh K., Birney E., Rogers J., Abril J. F., Agarwal P., Agarwala R., Ainscough R., Alexandersson M., An P., Antonarakis S. E., Attwood J., Baertsch R., Bailey J., Barlow K., Beck S., Berry E., Birren B., Bloom T., Bork P., Botcherby M., Bray N., Brent M. R., Brown D. G., Brown S. D., Bult C., Burton J., Butler J., Campbell R. D., Carninci P., Cawley S., Chiaromonte F., Chinwalla A. T., Church D. M., Clamp M., Clee C., Collins F. S., Cook L. L., Copley R. R., Coulson A., Couronne O., Cuff J., Curwen V., Cutts T., Daly M., David R., Davies J., Delehaunty K. D., Deri J., Dermitzakis E. T., Dewey C., Dickens N. J., Diekhans M., Dodge S., Dubchak I., Dunn D. M., Eddy S. R., Elnitski L., Emes R. D., Eswara P., Eyraas E., Felsenfeld A., Fewell G. A., Flicek P., Foley K., Frankel W. N., Fulton L. A., Fulton R. S., Furey T. S., Gage D., Gibbs R. A., Glusman G., Gnerre S., Goldman N., Goodstadt L., Grafham D., Graves T. A., Green E. D., Gregory S., Guigo R., Guyer M., Hardison R. C., Haussler D., Hayashizaki Y., Hillier L. W., Hinrichs A., Hlavina W., Holzer T., Hsu F., Hua A., Hubbard T., Hunt A., Jackson I., Jaffe D. B., Johnson L. S., Jones M., Jones T. A., Joy A., Kamal M., Karlsson E. K., et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**: 520-62.
- Webster K. E. (1961). Cortico-striate interrelations in the albino rat. *J Anat* **95**: 532-44.

- Wei C. L., Wu Q., Vega V. B., Chiu K. P., Ng P., Zhang T., Shahab A., Yong H. C., Fu Y., Weng Z., Liu J., Zhao X. D., Chew J. L., Lee Y. L., Kuznetsov V. A., Sung W. K., Miller L. D., Lim B., Liu E. T., Yu Q., Ng H. H., and Ruan Y. (2006). A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* **124**: 207-19.
- Wellington C. L., Leavitt B. R., and Hayden M. R. (2000). Huntington disease: new insights on the role of huntingtin cleavage. *J Neural Transm Suppl*: 1-17.
- Wexler N. S., Lorimer J., Porter J., Gomez F., Moskowitz C., Shackell E., Marder K., Penchaszadeh G., Roberts S. A., Gayan J., Brocklebank D., Cherny S. S., Cardon L. R., Gray J., Dlouhy S. R., Wiktorski S., Hodes M. E., Conneally P. M., Penney J. B., Gusella J., Cha J. H., Irizarry M., Rosas D., Hersch S., Hollingsworth Z., MacDonald M., Young A. B., Andresen J. M., Housman D. E., De Young M. M., Bonilla E., Stillings T., Negrette A., Snodgrass S. R., Martinez-Jaurrieta M. D., Ramos-Arroyo M. A., Bickham J., Ramos J. S., Marshall F., Shoulson I., Rey G. J., Feigin A., Arnheim N., Acevedo-Cruz A., Acosta L., Alvir J., Fischbeck K., Thompson L. M., Young A., Dure L., O'Brien C. J., Paulsen J., Brickman A., Krch D., Peery S., Hogarth P., Higgins D. S., Jr., and Landwehrmeyer B. (2004). Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3498-503.
- Wexler N. S., Young A. B., Tanzi R. E., Travers H., Starosta-Rubinstein S., Penney J. B., Snodgrass S. R., Shoulson I., Gomez F., Ramos Arroyo M. A., and et al. (1987). Homozygotes for Huntington's disease. *Nature* **326**: 194-7.
- Willis T., Meyer A., and Hierons R. (1964). A Note On Thomas Willis' Views On The Corpus Striatum And The Internal Capsule. *J Neurol Sci* **11**: 547-54.
- Wilson C. J., Xu Z. C., Emson P. C., and Feler C. (1990). Anatomical and physiological properties of the cortical and thalamic innervations of neostriatal tissue grafts. *Prog Brain Res* **82**: 417-26.
- Wilson S. (1914). An experimental research into the anatomy and physiology of the corpus striatum. *Brain* **36**: 427-492.
- Wu Y., Richard S., and Parent A. (2000). The organization of the striatal output system: a single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neurosci Res* **38**: 49-62.
- Wytenbach A., Swartz J., Kita H., Thykjaer T., Carmichael J., Bradley J., Brown R., Maxwell M., Schapira A., Orntoft T. F., Kato K., and Rubinsztein D. C. (2001). Polyglutamine expansions cause decreased CRE-mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **10**: 1829-45.
- Yamada K., Sakai M., Okamura H., Iбата Y., and Nagatsu I. (1992). Detection of tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine-N-methyltransferase messenger RNAs in the mouse adrenal gland and the brain by in situ hybridization. *Histochemistry* **97**: 201-6.
- Yang G., Xu Y., Chen X., and Hu G. (2007). IFITM1 plays an essential role in the antiproliferative action of interferon-gamma. *Oncogene* **26**: 594-603.
- Yao P. J., Zhu M., Pyun E. I., Brooks A. I., Therianos S., Meyers V. E., and Coleman P. D. (2003). Defects in expression of genes related to synaptic vesicle trafficking in frontal cortex of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **12**: 97-109.
- Ye S. Q., Zhang L. Q., Zheng F., Virgil D., and Kwitrovich P. O. (2000). miniSAGE: gene expression profiling using serial analysis of gene expression from 1 microg total RNA. *Anal Biochem* **287**: 144-52.
- Young A. B., Shoulson I., Penney J. B., Starosta-Rubinstein S., Gomez F., Travers H., Ramos-Arroyo M. A., Snodgrass S. R., Bonilla E., Moreno H., and et al. (1986). Huntington's disease in Venezuela: neurologic features and functional decline. *Neurology* **36**: 244-9.

- Zala D., Benchoua A., Brouillet E., Perrin V., Gaillard M. C., Zurn A. D., Aebischer P., and Deglon N. (2005). Progressive and selective striatal degeneration in primary neuronal cultures using lentiviral vector coding for a mutant huntingtin fragment. *Neurobiol Dis* **20**: 785-98.
- Zapala M. A., Hovatta I., Ellison J. A., Wodicka L., Del Rio J. A., Tennant R., Tynan W., Broide R. S., Helton R., Stoveken B. S., Winrow C., Lockhart D. J., Reilly J. F., Young W. G., Bloom F. E., Lockhart D. J., and Barlow C. (2005). Adult mouse brain gene expression patterns bear an embryologic imprint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10357-62.
- Zeron M. M., Fernandes H. B., Krebs C., Shehadeh J., Wellington C. L., Leavitt B. R., Baimbridge K. G., Hayden M. R., and Raymond L. A. (2004). Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci* **25**: 469-79.
- Zhang L., Zhou W., Velculescu V. E., Kern S. E., Hruban R. H., Hamilton S. R., Vogelstein B., and Kinzler K. W. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* **276**: 1268-72.
- Zhang W., Morris Q. D., Chang R., Shai O., Bakowski M. A., Mitsakakis N., Mohammad N., Robinson M. D., Zirngibl R., Somogyi E., Laurin N., Eftekharpour E., Sat E., Grigull J., Pan Q., Peng W. T., Krogan N., Greenblatt J., Fehlings M., van der Kooy D., Aubin J., Bruneau B. G., Rossant J., Blencowe B. J., Frey B. J., and Hughes T. R. (2004). The functional landscape of mouse gene expression. *J Biol* **3**: 21.
- Zhao L. Y., Niu Y., Santiago A., Liu J., Albert S. H., Robertson K. D., and Liao D. (2006). An EBF3-Mediated Transcriptional Program That Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Cancer Res* **66**: 9445-9452.
- Zhao M., Momma S., Delfani K., Carlen M., Cassidy R. M., Johansson C. B., Brismar H., Shupliakov O., Frisen J., and Janson A. M. (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7925-30.
- Zhao X., Lein E. S., He A., Smith S. C., Aston C., and Gage F. H. (2001). Transcriptional profiling reveals strict boundaries between hippocampal subregions. *J Comp Neurol* **441**: 187-96.
- Zirlinger M., Kreiman G., and Anderson D. J. (2001). Amygdala-enriched genes identified by microarray technology are restricted to specific amygdaloid subnuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5270-5.
- Zuccato C., Liber D., Ramos C., Tarditi A., Rigamonti D., Tartari M., Valenza M., and Cattaneo E. (2005). Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery. *Pharmacol Res* **52**: 133-9.